

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR



Digitized by the Internet Archive
in 2024

ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

PUBLIÉES PAR

LA DIRECTION DE L'INSTITUT PASTEUR

Avec le concours des Chefs de Service
et des Chefs de Laboratoire

Secrétaire général : P. LÉPINE

TOME QUATRE-VINGT-UNIÈME

Juillet-Décembre 1951

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS

Libraires de l'Académie de Médecine

120, Boulevard Saint-Germain

PARIS

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

PARIS

LE DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

ET LE VICE-DIRECTEUR

ONT L'HONNEUR DE VOUS PRÉSENTER

LA REVUE DE L'INSTITUT PASTEUR

PARIS. — ANC. IMP. DE LA COUR D'APPEL, 1, RUE CASSETTE. — 1951

LE DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

ET LE VICE-DIRECTEUR

ONT L'HONNEUR DE VOUS PRÉSENTER

LA REVUE DE L'INSTITUT PASTEUR

PARIS, CASSETTE, 1, RUE CASSETTE.

1951

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE DES CORPS DE NEGRI DANS LA RAGE DES RUES. MÉTHODE DE REPÉRAGE ET D'EXAMEN DES COUPES HISTOLOGIQUES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

par P. LÉPINE et O. CROISSANT (*).

(*Institut Pasteur. Service des Virus.*)

Un travail récent de Reagan et Brueckner [4] publie les premières photographies de corps de Negri dans la rage. Les préparations ont été faites par la méthode des calques, obtenus par impression de grilles microscopiques recouvertes de parlodion sur des tranches de cerveau frais de souris inoculées avec un virus rabique des rues. Les images reproduites sont assez floues, d'une définition qui laisse à désirer en raison de l'opacité des corps de Negri et, comme dans toute méthode par calques ou frottis, les rapports cellulaires sont bouleversés, ce qui laisse planer un doute sérieux sur la nature et l'interprétation de certaines des formations observées.

Nous avons nous-mêmes employé, il y a plus de trois ans, la technique des calques suivie par les auteurs américains; nous croyons en avoir les premiers fait l'application au microscope

(*) *Société française de Microbiologie*, séance du 7 juin 1951.

électronique par l'étude des varioles animales (Lépine, Atanasiu et Croissant [2]) où elle nous a donné les plus beaux résultats ; mais dès le début de nos essais sur le virus rabique nous l'avons abandonnée devant les inconvénients qu'elle présente, dont les plus graves sont les aléas de l'exploration des préparations au hasard et l'absence de toute possibilité de repérage par rapport aux structures anatomiques normales.

Nous avons récemment repris ce travail à propos de l'application de la méthode histologique des coupes ultrafines à la microscopie électronique. A titre de contrôle de la méthode que nous avons mise au point, nous avons procédé à l'examen au microscope électronique des coupes de cerveaux rabiques, démontrant, par la mise en évidence des corps de Negri *in situ*, la possibilité d'établir la corrélation entre les images de la microscopie en optique lumineuse et celles de l'optique électronique. Le principe de la méthode consiste à faire porter l'examen sur les mêmes cellules ou groupes de cellules dans des champs exactement repérés sur des coupes consécutives du même bloc.

Notre technique est la suivante : le matériel (dans le cas particulier, cerveau de souris inoculée avec un virus rabique négri-gène) est prélevé, fixé et inclus en paraffine de la manière usuelle. Le bloc orienté est entamé sur un microtome de Minot jusqu'à ce que les coupes, recueillies, montées et colorées selon la technique classique, mettent en évidence la région intéressante.

Celle-ci est examinée au microscope comme pour un diagnostic ordinaire. Lorsque l'examen à l'objectif à immersion rencontre un champ que l'on désire examiner au microscope électronique, celui-ci est repéré au grossissement fort à sec au moyen d'un objectif marqueur ou d'un cercle tracé à l'encre. On passe alors au grossissement à sec le plus faible pour dessiner (à la chambre claire ou à main levée) sur le papier un schéma d'orientation de la coupe avec les repères anatomiques principaux et l'emplacement du cercle marqué.

Le bloc paraffiné est alors démonté de son support ; en travaillant à la loupe binoculaire et en s'aidant du schéma tracé, on repère sur la tranche de coupe du bloc, et on dessine à l'aiguille dans la paraffine, l'emplacement correspondant au cercle traceur sur la préparation. Cet emplacement est ensuite découpé dans le bloc, soit au rasoir, soit à l'emporte-pièce, sous le contrôle de la vue à la loupe. On a soin de donner au prélèvement la forme d'une pyramide dont la base est formée par la région repérée sur la tranche de coupe, qui est dès lors automatiquement identifiée dans les manipulations ultérieures.

Le bloc minime ainsi obtenu, qui mesure au maximum 1 mm dans chaque dimension, est alors immergé dans le toluol pendant quelques heures, puis passé du toluol dans la solution de mono-

mère de méthacrylate de butyle (1). Le monomère contenant la pièce est ensuite polymérisé à l'étuve en tubes de gélatine, selon la technique de Newman, Borysko et Swerdlow [3, 4].

On obtient finalement une pièce minuscule de la dimension d'une petite tête d'épingle, incluse dans un cylindre de plexiglas.

Ce dernier est alors débité en coupes ultra-fines au microtome Spencer muni d'un dispositif d'avance thermique selon Newman, Borysko et Swerdlow (*loc. cit.*) dont nous avons, après de nombreux essais, jugé les résultats supérieurs par leur régularité à ceux obtenus avec le dispositif d'avance mécanique de Baker et Pease [5] employé tout d'abord.

Nous avons remplacé le rasoir classique par la tranche d'une arête vive de verre, selon la technique décrite par Lata et Hartmann [6], dont nous avons reproduit le dispositif de montage. Les rasoirs de verre sont constitués par l'arête de section de losanges de 4×2 cm débités au diamant dans de la glace de Saint-Gobain de 8 mm d'épaisseur (fig. 1).

Les coupes recueillies une à une au pinceau de martre sont étalées à la surface d'un mélange dioxane-eau à parties égales. Les coupes étalées sont très difficilement visibles à l'œil nu, mais elles donnent des franges d'interférence du deuxième ordre. Une fois dépliées, les coupes sont transportées sur une membrane en formvar flottant à la surface d'une boîte de Petri remplie d'eau. À l'aide du micromanipulateur, la portion intéressante de la coupe est montée au centre d'une grille immergée, dont cinq mailles sont visibles dans le diamètre du champ microscopique. Cette technique de « pêche à l'épuisette » a été primitivement conçue et décrite pour l'observation au microscope électronique des cellules individuelles dans les cultures de tissus (Barski, Maurin et Croissant [7]) ; sa précision n'est pas moins grande dans le choix du matériel histologique. On opère pour cela au microscope ordinaire, ou mieux au microscope à contraste de phase. Ce dernier seul permet de distinguer les contours et les structures cellulaires et d'amener le micromanipulateur à centrer les grilles sur le groupe cellulaire repéré. Nous avons utilisé divers dispositifs de contraste de phase, en particulier celui de Françon et Nomarski [8].

Après séchage, les préparations sont immergées au moins vingt-quatre heures dans un solvant du polymère. Elles sont ensuite métallisées selon la technique de Williams et Wyckoff [9] par évaporation d'or ou d'alliage or-palladium, pratiquée obliquement ou à la verticale, puis montées sur porte-objet et examinées au micro-

(1) Nous exprimons tous nos remerciements à M. A. Dauvillier, chef du Laboratoire de Recherches de la Société Alsthom, qui nous a procuré les solutions de monomères ainsi que celles de plastifiants, et nous a initiés aux techniques de la polymérisation des matières plastiques.

scope électronique, de la manière classique. Il y a avantage, pour l'examen des coupes histologiques, à employer les pièces polaires de lentilles objectives décrites par Hillier [40], qui facilitent l'orientation topographique dans l'exploration de la coupe et sont moins sujettes à la contamination par le matériel histologique, mais elles ne sont pas indispensables si l'on travaille aux grossissements les plus faibles.

Une coupe plus épaisse du même bloc est montée sur lame de

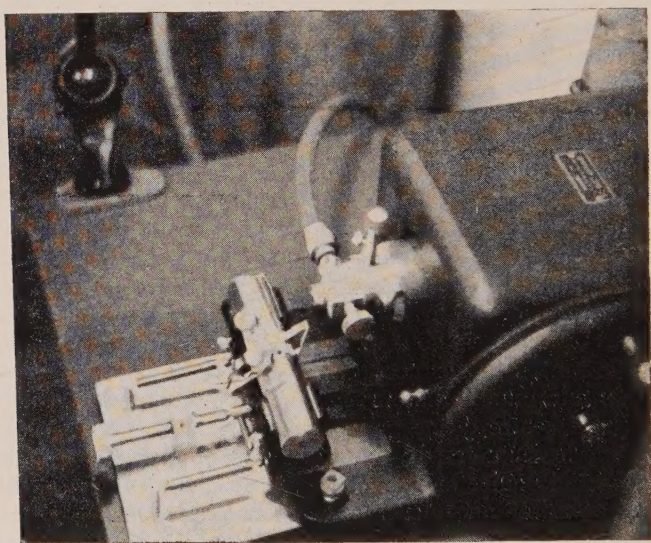


FIG. 1. — Montage et adaptation du microtome Spencer pour l'exécution des coupes ultrafines.

On remarquera de gauche à droite :

1. Le dispositif d'ajustage par vis réglant l'approche du rasoir pour l'entame du bloc;
 2. le support cylindrique, remplaçant sur son portoir le rasoir du microtome, qui maintient le losange de verre dont une arête exécute les coupes (dispositif de Lata et Hartmann);
 3. insérée dans l'emplacement où l'on monte habituellement le porte-bloc, la chambre de détente conditionnant l'avance thermique (dispositif de Newman, Borysko et Swerdlow);
- le bloc, portant la pièce incluse dans le plexiglas, est fixé sur la partie antérieure du support, regardant l'opérateur (un bloc démonté est posé à côté du porte-rasoir); à droite du dispositif, la vis de réglage de détente du CO_2 ; à gauche, l'arrivée du tube souple relié à la bombonne du CO_2 liquide. Pour opérer on détend du CO_2 jusqu'à apparition de givre sur la chambre de détente; on arrête alors l'arrivée du gaz, et le réchauffement de la chambre fait avancer le bloc portant la pièce à couper vers l'arête tranchante du couteau de verre. Il suffit de donner un tour de manivelle toutes les deux secondes environ pour obtenir la coupe.

verre et, après dissolution de la matière plastique, colorée de la façon habituelle, pour contrôle au microscope ordinaire du repérage du prélèvement.

Si le montage a été fait correctement, on tombe d'emblée, ou presque, au microscope électronique sur le groupe cellulaire repéré préalablement au microscope lumineux.

Nous avons expérimenté cette technique en abordant l'étude histologique des corps de Negri dans la rage, dont nous apportons les premiers résultats.

Les figures 1 et 2 (planches hors-texte) donnent respectivement une vue au microscope ordinaire d'une coupe de contrôle colorée au Mann (fig. 1) du fragment qui a été prélevé après repérage dans une inclusion en paraffine, détaché et remonté en plexiglas, et une coupe fine (fig. 2) du même bloc telle qu'elle apparaît en contraste de phase au cours du montage sur les grilles. La figure 3 montre, au contraste de phase, une cellule isolée et son corps de Negri au moment du centrage de la grille.

Les figures 4, 5 et 6 de la planche I donnent un aperçu des détails cellulaires tels qu'ils apparaissent au plus faible grossissement (3 300 diamètre sur l'écran) du microscope électronique. La déshydratation d'une part, l'action des fixateurs et la minceur de la coupe d'autre part, réduisent la structure cellulaire à une sorte d'architecture spongieuse à structure réticulée où les détails tels que la membrane basale du noyau, le nucléole, le réseau de basichromatine intranucléaire restent très discernables. A l'extérieur du noyau apparaissent un ou plusieurs corps de Negri, les uns homogènes, les autres doués de structure interne. Les diamètres des corps de Negri mesurés sur ces clichés sont de $1,2 \mu$ à $3,4 \mu$. L'examen à un grossissement supérieur (pl. II, fig. 7 à 10) permet un examen plus détaillé des corps de Negri, en particulier de ceux présentant une structure interne.

Le corps de Negri apparaît ainsi comme une masse compacte, offrant une structure différente de celle du protoplasme cellulaire, mais non homogène. L'ensemble se compose d'une substance fondamentale finement granuleuse, non réticulée, paraissant résulter de l'agglomération de très petites particules, au sein de laquelle tranchent, d'une part, des pertes de substance plus ou moins circulaires à travers lesquelles on aperçoit la trame du protoplasme cellulaire, et, d'autre part, une ou plusieurs masses opaques, rondes ou grossièrement carrées, homogènes et imperméables aux électrons, correspondant aux granulations basophiles vues dans les corps de Negri colorés au Mann, alors que les pertes de substance répondent aux plages claires à l'examen au microscope lumineux.

Nous n'avons jusqu'ici pu, contrairement à ce qui se passe avec les inclusions des corps de Guarnieri [41] dans la vaccine ou les

corps de Bollinger [2] dans la variole aviaire, résoudre l'inclusion des corps de Negri en corps élémentaires d'une taille correspondant au diamètre particulaire admis pour le virus rabique (120 à 150 m μ), sur la foi de nombreuses expériences d'ultrafiltration et d'ultracentrifugation.

Il est possible que les corps opaques habituellement visibles dans le corps de Negri représentent le virus lui-même ou un agrégat de particules virulentes. La mensuration sur le cliché n° 7 (effectuée sur la base d'un diamètre de 2 780 Å attribué aux particules de latex Dow 580 G, selon les plus récentes mensurations de Yudo-witch [12]), assigne à trois de ces corps opaques en particulier un diamètre de 320, 380 et 540 m μ : ce diamètre est donc variable d'un corps à un autre.

Les plages claires en forme de trous semblent, d'autre part, résulter de l'arrachement par le rasoir de particules hétérogènes, ayant la taille des corps opaques, et que l'on voit sur plusieurs images se séparer nettement de la substance fondamentale du corps de Negri. Elles seraient la « niche » laissée vide dans le corps de Negri par l'expulsion d'une masse ayant un diamètre moyen de l'ordre de celui attribuable à un agglomérat de trois ou quatre particules de virus rabique (fig. 7, 8, 10).

Ces structures hétérogènes, que l'on voit se dessiner ou que l'on devine dans la masse des corps de Negri, et les pertes de substance formant les plages claires ont des diamètres sensiblement identiques, s'échelonnant les uns et les autres entre 320 et 520 m μ , avec un maximum de fréquence entre 380 et 410 m μ .

Le corps de Negri lui-même apparaît ainsi moins comme l'agglomération de particules virulentes que comme une coagulation du plasma cellulaire autour d'un ou plusieurs corps élémentaires virulents, ou encore comme l'agglomération et l'enrobement du virus masqué par les anticorps cellulaires. En d'autres termes, quelle que soit l'explication donnée des images électroniques, les corps de Negri ne paraissent pas résulter seulement de la présence et de la multiplication du virus dans la cellule, mais semblent comporter une participation cellulaire importante à titre de réaction (de dégénérescence ou de défense) autour du virus.

Il est à souligner que cette interprétation se trouve en bon accord avec les observations faites au cours de l'étude histochemique des lésions dues aux virus (P. Lépine et V. Sautter [13]), montrant que, dans les corps de Negri, seules les « structures internes » présentent les réactions colorées caractéristiques des acides nucléiques.

CONCLUSION.

La méthode décrite permet de repérer exactement des groupes cellulaires dans une préparation histologique et d'en effectuer

l'examen au microscope électronique sur les tranches de coupes immédiatement consécutives du bloc d'inclusion, après prélèvement et réinclusion en matière plastique.

Cette technique permet facilement l'examen des corps de Negri dans la rage. Ceux-ci apparaissent davantage comme une réaction cellulaire autour du virus que comme une simple agrégation de particules virulentes à l'état pur. Cependant, les masses hétérogènes qui tranchent dans la substance fondamentale de l'inclusion et qui forment des corps opaques aux électrons pourraient représenter le virus lui-même. Les pertes de substance découpant de véritables trous dans les corps de Negri paraissent être les traces laissées par l'arrachement de ces corps hétérogènes.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. L. REAGAN et A. L. BRUECKNER. *J. Infect. Dis.*, 1950, **87**, 213.
- [2] P. LÉPINE, P. ATANASIU et O. CROISSANT. *Ces Annales*, 1948, **75**, 279.
- [3] S. B. NEWMAN, E. BORYSKO et M. SWERDLOW. *Science*, 1949, **110**, 66.
- [4] S. B. NEWMAN, E. BORYSKO et M. SWERDLOW. *J. Research Nat. Bureau of Standards*, 1949, **43**, 183.
- [5] R. F. BAKER et D. C. PEASE. *J. Appl. Physics*, 1949, **20**, 480.
- [6] H. LATA et J. F. HARTMANN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **74**, 436-439.
- [7] G. BARSKI, J. MAURIN et O. CROISSANT. *Ces Annales*, 1949, **76**, 1-5.
- [8] M. FRANÇON et G. NOMARSKI. *Revue d'Optique*, 1950, **29**, 619-631.
- [9] R. C. WILLIAMS et R. W. WYCKOFF. *J. Appl. Physics*, 1946, **17**, 23.
- [10] J. HILLIER. *J. Applied Physics*, 1951, **22**, 135-137.
- [11] J. WIRTH, P. ATANASIU, G. BARSKI et O. CROISSANT. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 827.
- [12] K. L. YUDOWITCH. *J. Applied Physics*, 1951, **22**, 214.
- [13] P. LÉPINE et V. SAUTTER. *Ces Annales*, 1946, **72**, 174-183.

PLANCHE I

FIG. 1. — Rage des rues : cerveau de souris, corne d'Ammon, coloration Mann. Aspect de la coupe au microscope en lumière normale. (Gross. : 900.) Présence de nombreux corps de Negri.

FIG. 2. — Même cerveau, même région. Coupe du fragment inclus dans le plexiglas, examiné sans coloration au microscope à contraste de phase. (Gross. : 900). On distingue nettement les contours et la structure des noyaux ainsi qu'un certain nombre de corps de Negri.

FIG. 3. — Même préparation que la figure 2, examinée au microscope à contraste de phase, sans coloration au cours du montage pour le microscope électronique : identification d'un corps de Negri au voisinage du noyau d'un neurone. (Gross. : original 530, agrandi à 1 450 pour reproduction.)

FIG. 4. — Examen au microscope électronique de la région repérée en contraste de phase sur la figure 2. La figure est formée de la réunion de trois clichés

électroniques contigus. On voit deux noyaux de neurones avec leur chromatine et leur nucléoles, et cinq corps de Negri nettement reconnaissables au voisinage de la membrane basale du noyau. (Gross. : 4 200 par agrandissement de clichés originaux pris au gross. 3 500).

FIG. 5. — Corps de Negri avec structure interne constituée de corps opaques (ici masse claire) et de pertes de substance (correspondant aux plages claires des coupes colorées); le corps de Negri est accolé à la membrane basale d'un noyau nettement reconnaissable. (Gross. : 4 200, par agrandissement d'un cliché original à 3 500.)

FIG. 6. — Corps de Negri avec structure interne au voisinage d'un noyau apparaissant dans sa presque totalité sur le cliché. Noter les relations du corps de Negri avec la structure réticulée du protoplasme cellulaire et avec la membrane basale du noyau. (Gross. : 4 300, par agrandissement d'un cliché original à 3 500).

PLANCHE II

FIG. 7. — Détails d'un corps de Negri (corps de Negri de la figure 5, gross. : 20 000, agrandissement du cliché original à 14 000). Noter les détails de la structure interne, l'existence de plusieurs masses opaques dont les plus petites, dans la partie moyenne, ont une taille de l'ordre de celle attribuable au virus rabique. Dans la partie supérieure, corps opaque paraissant s'extraire de la masse des corps de Negri et amorcer un trou, semblable aux trois autres, visibles sur le même corps de Negri.

FIG. 8. — Corps de Negri (corps de Negri de la figure 6, gross. : 16 000, agrandissement du cliché original à 10 800); noter l'individualisation d'une série de corps hétérogènes, correspondant aux structures internes, qui amorcent des pertes de substance circulaires.

FIG. 9. — Corps de Negri dans un neurone. (Gross. : 11 000 par agrandissement du cliché original à 7 500.)

FIG. 10. — Même corps de Negri à plus fort grossissement. (Gross. : 18 000 par agrandissement du cliché original à 12 500.) On voit nettement se dessiner sous forme de cercle correspondant à une dépression périphérique les masses hétérogènes, qui s'individualiseront sur d'autres corps de Negri en corps opaques et finalement en trous.

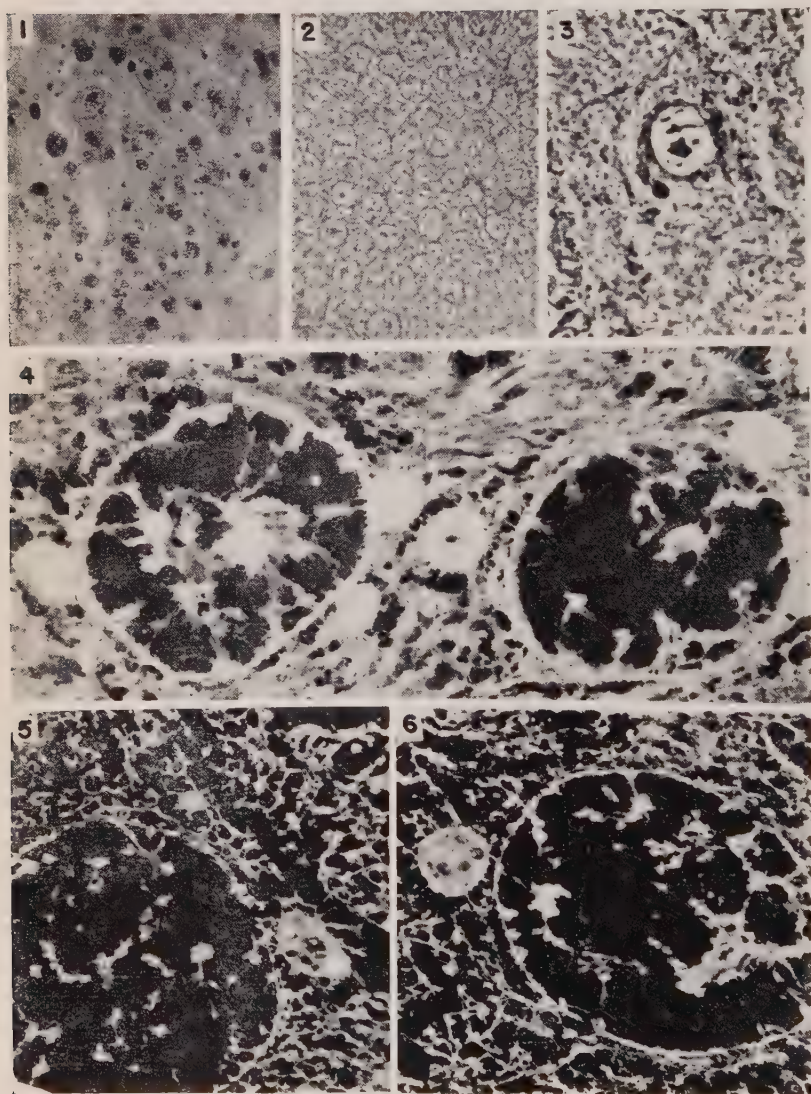


PLANCHE I.

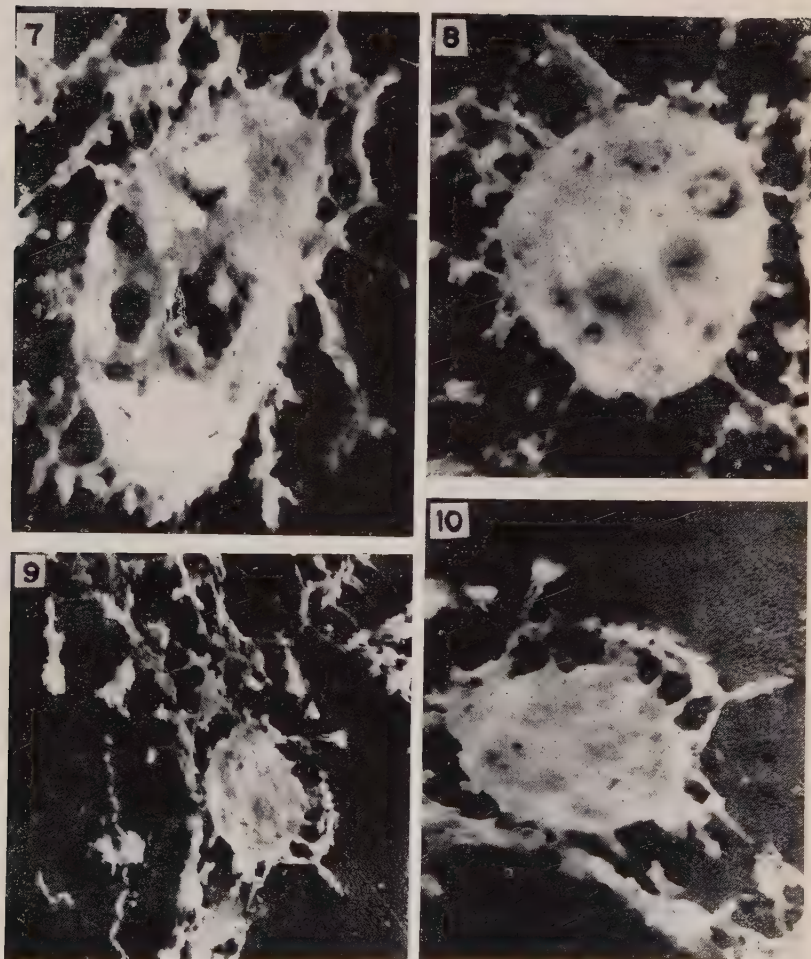


PLANCHE II.

CONDITIONS DE NUTRITION CELLULAIRE *IN VITRO* EN CULTURE SANS SUPPORT PLASMATIQUE.

RÔLE DES FRACTIONS MICRO- ET MACROMOLÉCULAIRES

par G. BARSKI, J. MAURIN, G. WIELGOSZ et P. LÉPINE (*).

(Institut Pasteur. Service des Virus.)

Le problème de la détermination chimique des exigences nutritives des cellules animales cultivées *in vitro* — qui constitue l'essentiel du problème de la biosynthèse animale — a pris récemment un nouvel essor avec les travaux visant la réalisation d'un milieu de culture tissulaire entièrement synthétique, de composition connue (White [52], Morgan, Morton et Parker [37]).

Pour éprouver la valeur de leurs milieux, ces auteurs cultivent des tissus fraîchement explantés en différentes solutions synthétiques, aussi complètes que possible, jusqu'à l'apparition des signes de dégénérescence. C'est la durée de survie des explants qui constitue pour eux la mesure de la valeur du milieu.

Fischer [20], qui a également mis au point un milieu synthétique, ne considère pourtant pas ce dernier comme un milieu complet et ne l'utilise que comme appoint au plasma dialysé.

On pourrait remarquer, à propos des travaux de White et de Morgan et collab., que la durée de la survie mesure une qualité différente de celle qu'on recherche depuis les premiers travaux de Carrel [5, 6, 7] pour expliquer la nécessité d'adjoindre aux milieux de culture tissulaire des substances provenant de l'organisme même.

On peut, en effet, imaginer l'existence d'un milieu synthétique équilibré assurant aux cellules une survie qui s'étalerait sur des semaines, voire des mois, sans pour autant leur permettre une biosynthèse suffisante pour déterminer une augmentation du volume de la matière vivante.

Le vrai problème consiste donc à établir quelle est la nature des substances qui assurent aux tissus animaux cultivés *in vitro* cette croissance rapide et illimitée que nous observons dans les

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 avril 1951.

cultures classiques pratiquées en milieux complexes d'origine animale (plasma ou sérum et extraits tissulaires), croissance qui est très différente de la simple survie ou de la « croissance résiduelle » (Carrel et Ebeling [6]) observée dans les diverses solutions physiologiques. La possibilité d'une telle survie, plus ou moins durable, même en solution physiologique ordinaire, a en effet été établie depuis longtemps [29, 30].

Le point essentiel de ce problème est donc la question de savoir s'il est possible ou non d'obtenir dans un milieu exempt de protéines, et plus généralement de grosses molécules, une vraie croissance tissulaire avec synthèse indiscutable de matière vivante.

Une réponse affirmative permettrait de considérer avec plus d'optimisme les travaux dont le but serait la synthèse d'un tel milieu, synthèse qu'il n'est actuellement possible d'envisager que dans le cas d'un ensemble non protidique.

Les essais de fractionnement d'un milieu nutritif naturel complet et, en particulier, de l'extrait embryonnaire (désigné ci-après par les lettres EE) en vue d'établir le rôle des fractions micro- et macromoléculaires ont été tentés depuis longtemps et par de nombreux auteurs.

La dialyse fut le premier procédé employé pour établir l'importance relative de ces fractions dans l'EE.

Wright [54] a prétendu obtenir un dialysat activant les divisions cellulaires. Mais ses cultures se faisaient, comme les cultures témoins, sur plasma complet, non dialysé, ce qui diminue la valeur de ses résultats. Baker et Carrel [4] ont constaté, au contraire, que le dialysat n'a aucune activité. Les substances actives de l'EE, d'après ces auteurs, ne sont pas dialysables, bien que la dialyse diminue leur valeur. Les conclusions de Fischer [20], qui a beaucoup étudié ce problème, sont identiques : dans l'EE les constituants micromoléculaires, dialysables, ne sont qu'un « facteur accessoire » de croissance qui facilite l'attaque des protides et la synthèse du cytoplasme par les cellules. L'adjonction de ces substances au plasma dialysé reconstitue un milieu complet. C'est à des conclusions presque semblables qu'arrivent Margoliash, Tenenbaum et Doljanski [33] qui ont étudié l'effet de la dialyse sur l'extrait de tissu de poule adulte, lequel, d'après ces auteurs, a une activité comparable à celle des extraits embryonnaires [24]. La dialyse abaisse considérablement le pouvoir mitogène de l'extrait tissulaire ; le dialysat seul est inactif, mais on peut reconstituer pleinement la valeur du milieu en associant le dialysat concentré au résidu dialysé.

Une tentative pour éliminer par *ultrafiltration* du milieu de culture tissulaire les constituants macromoléculaires a été faite par Simms [44] : on sait que cet auteur a introduit dans la technique des cultures de tissus l'emploi du sérum ultrafiltré sur

membranes de collodion (Simms et Sanders [45]). Le produit de filtration du sérum ne contient pas de protéines décelables à l'acide trichloracétique. D'après Simms et Sanders, le sérum ultrafiltré (ci-après SUF) se prête très bien à la conservation des tissus adultes ou embryonnaires pendant sept à quatorze jours à la température ambiante ou à 37° C, à l'abri de la dégénérescence graisseuse. Cependant, pour obtenir une croissance il est avantageux d'ajouter 1 partie de sérum normal à 2 parties de SUF (*ibid.*). Hanks [21], en cultivant des tissus embryonnaires de poulet à la température de 29°-31° C, confirme qu'un milieu composé de sérum normal additionné de SUF conserve la vitalité cellulaire de la culture pendant soixante jours sans renouvellement. Morgan et Wiseman [36], cultivant dans du SUF (sans sérum normal) du tissu infecté par un virus, observent la présence des formes cellulaires viables jusqu'au huitième jour de la culture. Layton et Tutelman [25] comparent la croissance en tubes roulants des tissus embryonnaires fraîchement explantés, respectivement dans un milieu synthétique de White et dans du SUF. Ils constatent au départ une croissance durant quelques jours, et ensuite une conservation de la vitalité cellulaire qui s'étend sur plusieurs semaines. Le SUF se montre supérieur au milieu de White.

Pour séparer les fractions micro- et macromoléculaires des extraits tissulaires, certains auteurs ont employé également l'*ultracentrifugation*.

Fischer [16] constate que le principe actif de l'EE frais sédimente facilement par l'*ultracentrifugation* ou bien qu'une centrifugation à 16 000 t/min. pendant dix heures permet de recueillir un culot aussi actif que le surnageant [17]. Tennant, Liebow et Stern [47], employant la technique de Claude [8, 9], préparent par des centrifugations à 30 000 t/min. (67 000 $\times g$) pendant trente minutes et des lavages répétés une fraction macromoléculaire. Cette fraction présente une certaine activité stimulatrice sur la croissance des explants de cœur de souris nouveau-née par rapport au témoin en solution physiologique de Tyrode. La fraction macromoléculaire de Tennant garde son activité après chauffage à 100° C pendant quinze minutes. La comparaison avec un EE frais n'étant pas faite, on pourrait supposer avec Fischer [17] qu'il s'agit d'un effet résiduel non spécifique des extraits tissulaires inactivés, effet observé également par Lasnitzki (d'après Fischer [17]). Fischer a repris [17, 18] l'analyse des facteurs de croissance tissulaire au moyen de l'*ultracentrifugation*, employant comme matériel de départ un extrait traité par des procédés plus brutaux que d'habitude, notamment par la dessiccation à la température ambiante et même plus élevée. Ce traitement, bien qu'amenant une baisse d'activité de l'extrait, permet finalement

d'isoler des fractions actives plus stables et plus maniables que l'EE frais. D'après Fischer ce procédé, suivi de délipidation, libère les substances actives de leurs complexes macromoléculaires. En conséquence, une centrifugation de l'extrait ainsi préparé pendant trois à quatre heures à 30 000-35 000 t/min. ne modifie en rien ses propriétés, le surnageant restant aussi actif que le culot.

Tous les auteurs qui ont étudié les fractions micro- et macromoléculaires des milieux naturels de culture emploient, pour éprouver l'activité de leurs produits, la culture classique des fibroblastes dans une goutte de plasma coagulé. Les produits à essayer sont incorporés dans le support plasmatique. Dans certaines expériences de Fischer, le plasma du support est dialysé.

Or, il est évident qu'il est impossible de déterminer avec une précision suffisante les conditions de nutrition cellulaire, et en particulier le rôle des fractions micro- et macromoléculaires dans les cultures où le plasma est le constituant obligatoire du milieu. Le plasma ou le sérum ne peuvent aucunement être traités comme un milieu de base indifférent. Et il convient de rappeler que plusieurs auteurs ont démontré la possibilité d'une culture prolongée avec multiplication cellulaire de différents tissus dans un milieu constitué de sérum et de solution physiologique (Parker [38], des Ligneris [31], Verne [49]).

Un moyen nouveau pour aborder le problème d'évaluation des facteurs de croissance en culture tissulaire est apparu avec les techniques récentes de culture sur un support artificiel, biochimiquement inerte.

Au cours des dernières années, deux techniques de ce type ont été proposées : la technique de culture utilisant la cellophane de Evans, Earle et Shilling [15, 43] et celle utilisant les membranes plastiques, sur laquelle nous reviendrons plus loin.

Cellophane perforée et membranes plastiques se montrent, comme support mécanique, équivalentes au plasma coagulé. Pourtant, pour l'évaluation quantitative de la croissance d'une colonie de fibroblastes, notre méthode des membranes plastiques l'emporte. Elle permet, en outre, une culture préalable prolongée d'une colonie fibroblastique de forme régulière dans un milieu d'épuisement (sans EE) et sa transplantation pour la culture d'épreuve. Le tissu transplanté, soigneusement lavé, n'entraîne pratiquement aucun élément du milieu précédent. L'élimination complète, par lavage, du milieu de culture, permet la fixation et la coloration exclusive du tissu, la membrane polyvinylque ne prenant pratiquement pas le colorant. Ce fait nous a permis de mettre au point une technique nouvelle d'évaluation microphotométrique de la croissance tissulaire [4].

A l'aide de la méthode de culture sur membranes plastiques,

nous avons cherché à étudier le rôle que jouent dans un milieu de culture complet (sérum, extrait embryonnaire, solution physiologique) les constituants macromoléculaires. Les moyens de cette étude sont la dialyse, l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation.

Matériel et techniques.

TECHNIQUE DE CULTURE DE TISSUS. — La technique de culture sur membranes plastiques tire son origine des tentatives d'observation au microscope électronique de cellules isolées, émigrées et étalées en couche mince sur une membrane de formvar. Porter, Claude et Fullam [40] employaient à cette fin une pellicule de matière plastique adhérant à une lamelle de verre. Nous l'avons remplacée par une membrane plastique formée à la surface de l'eau et recueillie ensuite sur la lamelle [51, 3]. On a pu constater à cette occasion que les membranes libres, non collées contre le verre, sont très favorables au développement rapide et régulier des nappes épithéliales à partir du poumon embryonnaire [50].

Mais bientôt nous avons établi que cette méthode, qui semblait primitivement spécifique du tissu épithélial, est applicable à d'autres tissus embryonnaires, en particulier aux tissus nerveux et mésenchymateux [2] ainsi qu'aux tissus adultes ou tumoraux. En outre, la preuve a été apportée que la culture sur membranes plastiques peut être considérée comme une culture vraie ; elle peut, en effet, être poursuivie indéfiniment et se prêter aux repiquages [2]. Depuis lors, cette méthode a été mieux étudiée et perfectionnée. Nous allons décrire ici sa forme actuelle.

Les cultures se font sur une plaque de verre de 110×110 mm, dépolie sur toute sa surface, sauf 7 fenêtres carrées transparentes de 18×18 mm disposées sur 3 rangs (2, 3 et 2). Les 7 carrés sont compris dans un cercle de 100 mm de diamètre qui peut être recouvert par le couvercle d'une boîte de Petri.

On prépare les membranes de formvar en laissant tomber à la surface d'une solution de Ringer, dans une boîte de Petri, 1 goutte de solution de formvar dans du chlorure d'éthylène (dichloréthane) à 0,6 ou 0,8 p. 100. Si les cultures sont destinées à être poursuivies pendant longtemps, on emploiera la solution la plus concentrée. Les membranes se forment mieux à la surface d'une solution de Ringer refroidie à la glace. On recueille la membrane sur une lamelle couvre-objet de 18×18 mm, tenue avec une pince aux extrémités effilées. On place la lamelle sur une des fenêtres de la plaque de verre. Le tissu à cultiver est déposé ensuite sur la membrane, en réalité sur un coussin formé par une couche de solution physiologique enveloppée par la membrane et la faisant bomber. L'opération suivante est le rem-

placement de la solution de Ringer par le milieu de culture : avec une fine pipette Pasteur on perce la membrane au niveau d'un coin de la lamelle ; le liquide s'introduit facilement sous la membrane et y demeure malgré le trou. Le tissu déposé à la surface de la membrane baigne dans une gouttelette de milieu et sa nutrition se fait par échange d'éléments nutritifs entre cette goutte et le réservoir relativement important situé sous la culture, contenant 0,2 ml environ de milieu. H. J. Trurnit [48], étudiant dernièrement, à l'aide de la réaction antigène-anticorps, la perméabilité d'une membrane de formvar formée à la surface de l'eau, a prouvé que les échanges de grosses molécules protidiques à travers une telle membrane sont possibles.

Il s'avère certain que la disposition de la plus grande partie du milieu sous la membrane constitue le point essentiel de la technique. Elle garantit les conditions les plus favorables pour tous les fragments tissulaires au départ de la culture. Le fait que le volume du milieu se trouvant en contact immédiat avec le tissu soit très faible, semble jouer un rôle primordial (Earle et Thompson [14], Moen [35], Sanford, Earle et Likely [41]). Dans la suite, le maintien d'une mince couche capillaire au-dessus de la culture constitue une condition nécessaire pour lui assurer une bonne croissance avec le minimum de dégénérescence. Nous avons, en effet, pu établir que lorsque le niveau du milieu nutritif recouvrant les cultures dépasse le strict minimum, la dégénérescence du tissu apparaît plus rapidement. Il est évident qu'une couche si mince de milieu doit, pour pouvoir se maintenir en équilibre osmotique et réaliser en permanence de bonnes conditions nutritives, être en communication avec une réserve importante du milieu sous la membrane.

Dans les descriptions précédentes de la technique, nous avons insisté sur le rôle des anneaux de verre posés sur la membrane et destinés à maintenir un ménisque optimum du milieu. Ceci, dans le cas où on dispose le milieu *sur* la membrane, n'est réalisé qu'au centre de l'alvéole, car vers les bords à proximité de l'anneau, la couche du milieu est trop épaisse et accélère la dégénérescence du tissu. L'introduction du milieu en dessous de la membrane élimine naturellement cet inconvénient. Si nous continuons à employer les anneaux, c'est surtout pour maintenir en place la membrane plastique et le tissu qui y adhère, chose importante pendant les opérations de renouvellement du milieu, d'observation microscopique et de fixation-coloration.

Le renouvellement du milieu se fait par aspiration du milieu ancien et introduction sous la membrane avec une pipette Pasteur de milieu neuf. La cadence des renouvellements dépend du milieu et de la rapidité de la croissance. Il se fait en principe toutes les quarante-huit heures. Pour un milieu sans EE cette

cadence peut être portée à deux fois par semaine, même pour un tissu embryonnaire de croissance énergétique.

Les cultures, coiffées d'un couvercle de boîte de Petri scellé contre la plaque avec un mélange de paraffine et de cire d'abeille, sont alors mises en incubation à 37°5 C dans une étuve spécialement construite. Dans cette étuve les éléments chauffants se trouvent à la partie supérieure. Une répartition suffisamment égale de la température est assurée grâce à la présence à l'intérieur d'un ventilateur électrique. Au cours de l'incubation le milieu liquide ne quitte pas les lamelles et ne descend pas sur la surface dépolie de la plaque. Il est néanmoins nécessaire de stériliser à l'autoclave (et non au four) les plaques lavées préalablement au savon. Pour plus de précaution on peut les enduire légèrement de vaseline avant la stérilisation.

L'observation des cultures à l'état vivant, sans ouverture des boîtes, au faible grossissement, se fait à travers les fenêtres transparentes de la plaque. Il suffit de retourner la boîte, opération qui n'est pas dangereuse pour les cultures, à condition que les anneaux de verre soient confectionnés avec une tige de verre suffisamment mince.

La fixation et la coloration des cultures se font directement sur la lamelle qui les supporte. Nous avons utilisé dans ce travail l'hémalum-éosine et le bleu de toluidine comme colorants.

Les méthodes d'évaluation de la croissance tissulaire employées ont évolué au cours de ce travail même. Nous nous sommes contentés d'abord de la simple mesure de la surface de néocroissance d'après la méthode précédemment décrite [28] pour passer ensuite à la mesure photoélectrique de la lumière absorbée par la colonie cellulaire colorée au bleu de toluidine. Ainsi nous tirons pleinement parti du fait que la croissance sur membranes plastiques est remarquablement régulière et que le tissu, après l'élimination du milieu liquide, est incolore. Nous décrivons séparément tous les détails de cette méthode [4].

MILIEUX DE CULTURE. — Comme nous l'avons montré précédemment, on peut remplacer dans la culture sur membranes plastiques le milieu classique à base de plasma par un milieu liquide constitué par un mélange d'EE, de solution physiologique de type Tyrode et de la phase liquide du produit de coagulation du plasma. Ce milieu, tel que nous l'avons préconisé primitivement [2, 50], s'est avéré pratiquement équivalent à un simple mélange de sérum, d'EE et de solution physiologique. Ce fait facilite grandement la préparation des milieux et surtout les changements de composition.

Le *sérum normal* utilisé dans ces expériences est toujours du sérum homologue [sérum de poule (ci-après SP)].

Sérum dialysé. — Pour l'obtenir, nous dialysons 15 ml de sérum normal de poule dans des boyaux de cellophane contre 250 ml de Ringer pendant quatre jours à la température ambiante en changeant trois fois le bain de Ringer. Pour recueillir la fraction dialysable, nous répétons la même opération avec un autre échantillon de sérum en utilisant l'eau distillée au lieu de Ringer. L'eau est évaporée sous basse pression à la température de 45-48° C jusqu'à un volume réduit. Les substances actives dialysées sont récupérées ensuite d'après la technique décrite par Fischer et collaborateurs [19].

Sérum ultrafiltré. — Nous nous servons soit du sérum ultrafiltré de bœuf ou de cheval préparé industriellement d'après la méthode de Simms et Sanders (1), soit du sérum ultrafiltré de bœuf ou de poule que nous préparons dans notre laboratoire par 2 filtrations successives à travers les membranes gradocol de 240 μ et 24 μ de porosité. Tous les sérums ainsi obtenus donnent une réaction négative à l'acide trichloracétique. Ils se montrent de valeur équivalente en culture tissulaire.

Extraits embryonnaires. — L'EE type que nous utilisons est préparé par broyage avec des billes de verre d'embryons de poulet entiers de onze jours d'incubation. La pulpe est incubée pendant quinze minutes à 37° C avec une solution physiologique, à raison de 5 ml de solution par embryon, puis centrifugée pendant quinze minutes à 5 000 t/min. Le surnageant, laissé à la glacière pendant vingt-quatre heures, est recentrifugé le lendemain de la même façon. Cet extrait, distribué par 5 ml dans des ampoules Pyrex de 20 cm³, est lyophilisé après congélation rapide dans un mélange alcool-neige carbonique. Les ampoules sont remplies d'azote, avant d'être scellées, et conservées à -24° C. Après réhydratation avec 4,8 ml d'eau bidistillée, l'extrait a l'aspect d'un EE frais. Nous avons également préparé un extrait desséché à la température ambiante. Cet extrait doit être, d'après la suggestion de Fischer [47, 48], plus riche en facteurs de croissance dissociés des gros complexes moléculaires. Pour cette préparation nous extrayons la pulpe embryonnaire avec de l'eau bidistillée à raison de 2 ml d'eau par embryon de onze jours et nous desséchons le surnageant recueilli après centrifugation (dix minutes à 5 000 t/min.) dans un dessiccateur à CaCl₂ sous basse pression et à la température de 20° C environ. L'extrait desséché, et éventuellement délipidé, est repris avec 1 ml de solution physiologique et centrifugé pendant quinze minutes à 5000 t/min. Le surnageant est utilisé en culture (EEFi).

(1) Ce sérum ultrafiltré, ainsi que le milieu synthétique de Fischer, nous ont été aimablement fournis par *Microbiological Associates Inc.*, Coral Gables, Florida (U. S. A.).

La délipidation des extraits embryonnaires est effectuée sur un matériel lyophilisé ou desséché. (La délipidation des extraits liquides d'après la méthode de Davidson et Waymouth [41] ne nous a pas donné de résultats satisfaisants.) Nous avons délipidé à l'éther à la température de -60° à -70° C ou au benzène aux environs de $+6^{\circ}$ C. Le récipient contenant l'extrait desséché est agité avec un excès de solvant pendant quinze minutes, au cours desquelles le solvant est changé trois fois. Le benzène ou l'éther est ensuite éliminé, d'abord par insufflation d'air stérile pendant trente minutes et ensuite dans un dessiccateur sous basse pression pendant dix-huit à vingt heures en présence de CaCl_2 anhydre et de charbon activé.

Solutions physiologiques. — Toutes les solutions physiologiques employées sont préparées en eau bidistillée. Nous avons finalement adopté pour les cultures sur membranes plastiques la solution de Hanks [22] qui s'est montrée supérieure à la solution de Tyrode. Cette différence est due probablement au fait que la réserve alcaline de la solution de Hanks est moins importante, ce qui doit mieux correspondre aux conditions de culture sur membranes plastiques.

Tissus. — Pour déterminer la valeur des milieux de culture, nous cultivons différents tissus embryonnaires de poulet (onzième à quatorzième jour d'incubation) ou de souris, soit fraîchement explantés, soit précultivés. Si le tissu provient directement de l'organisme, les fragments destinés à l'explantation sont lavés pendant deux heures dans une solution physiologique de Ringer.

Pour les expériences principales qui sont destinées à fournir des données quantitatives, nous employons de préférence des tissus cultivés préalablement pendant huit à quatorze jours dans un milieu type composé de SP, 20 p. 100 ; SUF, 20 p. 100, et solution de Hanks, 60 p. 100. Cette règle, qui n'est pas respectée habituellement par les autres auteurs, semble essentielle pour la mise en évidence des facteurs de croissance [42, 43].

Les colonies de fibroblastes ou de tissu épithélial sont découpées, sous contrôle d'une loupe binoculaire et dans des conditions aseptiques, en fragments de taille comparable. Bien que nous attachions une attention particulière à cette opération délicate, la taille des fragments n'est pas rigoureusement identique. Les différences entre fragments ne dépassent habituellement pas 30 p. 100.

ULTRACENTRIFUGATION. — Les centrifugations destinées à séparer des fractions d'après leur taille moléculaire sont effectuées au moyen d'une ultracentrifugeuse de Henriot et Huguenard [23]. La vitesse moyenne de rotation, contrôlée à l'aide d'un système magné-

tique [26], est de 84 000 t/min., ce qui correspond pour cette centrifugeuse à une accélération de $173 \times g$. Théoriquement, toutes les particules (supposées sphériques) de diamètre supérieur à 6,45 μ [39] doivent être sédimentées après une centrifugation qui dure habituellement quatre heures. D'autre part, nous savons (expériences inédites) que la centrifugation dans des conditions identiques d'un échantillon du mélange ovalbumine, ovoglobuline et conalbumine fait déposer entièrement les ovoglobulines, comme le montrent les épreuves sérologiques.

La température du liquide centrifugé ne dépasse jamais, au cours de l'ultracentrifugation, 25°-27° C.

A la fin de l'opération nous prélevons, immédiatement après l'arrêt de la centrifugeuse, le tiers supérieur du surnageant qui est utilisé directement ou après dilution comme milieu de culture.

Les ultracentrifugations analytiques, destinées à déterminer la composition de nos milieux du point de vue taille moléculaire, utilisent l'ultracentrifugeuse du laboratoire [27] munie d'un système optique qui est essentiellement celui de Longsworth [32] dans lequel le diaphragme mobile est remplacé par une fente mobile. La source lumineuse est une lampe à vapeurs de mercure sans écran. Le rotor de cette centrifugeuse est le rotor analytique de Schramm [42].

DOSAGES CHIMIQUES. — Les dosages d'azote total sont faits par la méthode de Kjeldahl après minéralisation pendant une heure en présence de catalyseurs.

L'azote protidique est dosé par la même méthode après une précipitation à l'acide trichloracétique (1 ml de la solution est additionné de 9 ml d'acide trichloracétique à 5 p. 100 ; après un repos de quinze minutes le précipité est centrifugé et lavé trois fois avec une solution à 5 p. 100 du même acide).

Résultats expérimentaux.

A. CULTURES EN SÉRUM ULTRAFILTRÉ. — Nos résultats de culture en SUF confirment dans les grandes lignes les données qui se sont accumulées à ce sujet depuis l'introduction de ce milieu dans la technique de culture de tissus par Simms et ses collaborateurs. Si nous y avons attaché un intérêt particulier, c'est parce que l'absence de plasma dans nos cultures rend ces résultats plus significatifs.

Nous avons d'abord pleinement confirmé les observations de Simms sur la régression de la stéatose sous l'influence du lavage et de l'incubation pendant vingt-quatre à quarante-huit heures, avec le mélange suivant : SUF, 1 partie ; solution de Tyrode, 2 parties.

Les fragments de cœur, de poumon et d'autres tissus d'embryon

de poulet explantés dans ce milieu donnent une croissance très restreinte, par rapport au témoin explanté en milieu contenant en plus du sérum complet. La même observation est valable pour les tissus embryonnaires de souris.

La différence constatée concerne non seulement le volume de la croissance, mais aussi le caractère des cellules. Cette différence commence à se manifester vers le quatrième jour de la culture. En milieu contenant le SUF seul, les fibroblastes d'un aspect jusqu'alors parfaitement normal commencent à s'allonger et à s'amincir, prennent un aspect étioilé et ramifié, très caractéristique, qui diffère de la croissance beaucoup plus compacte qu'on voit dans le milieu témoin riche en protéines. Sur des préparations fixées, et colorées au bleu de toluidine, les fibroblastes cultivés en SUF seul ont un protoplasme bien plus clair, moins riche en substance basophile, que ceux de cultures parallèles en milieu complet.

Vers le sixième ou septième jour on observe encore, en milieu composé de SUF seul, des fibroblastes ou des cellules épithéliales viables, mais il est difficile de continuer ces cultures au delà du dixième jour ; les cellules se rétractent de plus en plus, s'arrondissent, deviennent granuleuses et la culture périt rapidement.

Si l'on traite, avec un milieu au SUF seul, une culture précédemment entretenue en milieu complet (SP + EE), on arrive à éliminer la stéatose, mais en même temps on arrête la croissance. Si l'on continue ces cultures avec du SUF seul, elles périssent également au bout d'une semaine à dix jours. Au contraire, si dans des cultures explantées en SUF seul, et présentant une croissance très limitée, on introduit au bout de quarante-huit heures un milieu complet, la croissance repart vigoureusement.

Si on complète le SUF avec de l'EE, on augmente l'importance de la migration et de la croissance tissulaires fibroblastique et épithéliale. On arrive dans ce milieu à avoir des cultures viables de deux à trois semaines. Mais le caractère de la croissance n'en reste pas moins spécial : elle est clairsemée, avec des cellules allongées, ramifiées et minces. L'addition à ce milieu de sérum normal lui rend sa pleine valeur.

En renonçant à l'EE, nous arrivons empiriquement à la formule d'un milieu de base très favorable au maintien de la culture en bon état avec des renouvellements plus espacés, tous les trois ou quatre jours. Ce milieu est constitué de SUF, 20 p. 100, SP, 20 p. 100, et solution de Hanks, 60 p. 100. Dans ce milieu nous arrivons à maintenir des cultures de fibroblastes pendant au moins six semaines en état de parfaite vitalité. L'addition d'EE à ces cultures se traduit par une reprise immédiate de la multiplication cellulaire et de la croissance, qui s'accompagne souvent d'une stéatose plus ou moins importante.

B. CULTURE EN MILIEUX DIALYSÉS. — Au cours d'une série d'expériences, nous avons voulu établir le comportement d'un tissu provenant de cœur et de poumon d'embryon de poulet (quatorze jours d'incubation) dans des milieux dont les constituants complexes (SP et EE) sont préalablement dialysés. Ces milieux sont, soit dilués avec des solutions synthétiques (Tyrode ou milieu de Fischer), soit reconstitués par addition des constituants dialysables récupérés. Les milieux témoins se composent à parties égales de SP, d'EE et de solution de Tyrode.

La croissance fibroblastique de fragments de cœur embryonnaire est très inégale, non seulement par son étendue, mais aussi par sa densité. Ainsi la surface moyenne occupée par cette croissance dans le milieu IV à base de SP et d'EE dialysés s'est avérée égale à la surface en milieu I, non dialysé, bien qu'en réalité elle soit beaucoup plus pauvre, vu son caractère très clairsemé. En revanche, la croissance épithéliale en « nappe », qu'on observe dans les cultures de poumon embryonnaire, est très régulière, en couche essentiellement unicellulaire. Cet épithélium peut, en outre, être considéré comme une croissance vraie et non plus comme une migration. Pour cette raison, nous avons retenu ce tissu pour comparer par la mesure de la surface, la croissance dans les différents milieux.

TABLEAU 1.

MILIEU n°	CONSTITUANTS DES MILIEUX EN PARTIES ÉGALES						NOMBRE de cultures	VALEUR de la croissance épithéliale	DÉVIATION individuelle moyenne
	Liquide Tyrode	Sérum normal	Sérum dialysé	EE normal	EE dialysé	Dialysat récupéré			
I	+	+		+			16	404	± 47
II	+	+		+++			12	283	± 36
III	+		+		+		16	109	± 34
IV	+		+		+++		12	191	± 67
V	+		+		+		12	184	± 47
VI			+		+	+	16	176	± 40
VII			+		+++	+	12	223	± 79

En milieux I, III et VI, les EE (dialysés ou non) sont dilués trois fois en solution Tyrode.
En milieu V, l'EE est dilué trois fois en milieu synthétique de Fischer.

Le milieu complet se montre plus favorable à la croissance épithéliale si l'EE est dilué. (Nous observons le contraire pour les fibroblastes.) En milieux dialysés la croissance, bien que moins abondante, se produit partout. Ainsi confirmons-nous les observations de White et Lasfargues [53]. L'effet immédiatement toxique des milieux dialysés, décrit par Fischer, ne se manifeste

visiblement que dans le cas où les milieux sont très concentrés.

Même dialysé, l'EE garde une importance certaine pour la culture, puisque sa dilution plus poussée diminue la valeur du milieu, comme le montre la comparaison des résultats en milieux IV et III, ainsi qu'en milieux VII et VI.

Les différences entre les milieux IV, V et VI ne sont pas significatives et ne permettent de tirer aucune conclusion. L'enrichissement des milieux dialysés par le dialysat (milieu VII) semble rétablir au moins en partie sa valeur, ce qui confirmerait les observations de Fischer [20] et de Margoliash [33]. Nos résultats, dans ce sens, ne sont pourtant pas entièrement concluants.

Au bout de douze jours de culture dans les milieux dialysés, toute croissance est arrêtée et le tissu, s'il est maintenu dans ces conditions, subit une dégénérescence progressive et meurt. En revanche, dans le milieu reconstitué (M VII) au bout de deux semaines on observe toujours une néocroissance normale. Si nous transplantons des fibroblastes cultivés pendant douze jours en milieu dialysé (M IV) dans un milieu complet, nous observons une reprise de la prolifération cellulaire normale.

Dans une autre série d'expériences, le tissu cultivé pendant deux semaines en l'absence d'EE et explanté ensuite en milieu contenant 20 p. 100 de sérum dialysé montre une migration très réduite et dégénère au bout de six à huit jours. Cette migration est néanmoins bien plus marquée qu'en solution de Hanks seule.

C. FRACTIONNEMENT DES MILIEUX NUTRITIFS PAR ULTRACENTRIFUGATION. — Toutes les expériences de ce chapitre ont été effectuées avec un tissu conjonctif provenant de cœur d'embryon de poulet au onzième jour d'incubation. Ce tissu est préalablement cultivé, pendant huit jours pour la première série, quatorze jours pour la deuxième et dix jours pour la troisième série, dans un milieu composé ainsi : SP, 20 p. 100 ; SUF, 20 p. 100 ; solution de Hanks, 60 p. 100. En outre, les fragments sont lavés avant la mise en culture définitive pendant deux à trois heures dans la solution de Ringer.

Les estimations quantitatives de la croissance sont faites pour chaque culture individuellement sur des préparations de ces cultures fixées au quatrième ou au sixième jour de culture et colorées au bleu de toluidine. Les mesures sont faites microphotométriquement d'après la méthode décrite [4]. Les chiffres correspondent, dans les tableaux, à l'extinction partielle du flux lumineux, due à la présence du tissu coloré. Nous admettons que les substances colorées dans la culture (essentiellement des nucléoprotéines) donnent une mesure suffisamment proche de la quantité de matière vivante présente dans cette culture [34].

Les cultures de la troisième série expérimentale sont soumises à un test complémentaire consistant à mesurer photoélectriquement le bleu de toluidine extrait des préparations colorées de ces cultures [4].

Dans la première série expérimentale nous avons voulu établir l'influence de l'élimination par ultracentrifugation de certaines fractions macromoléculaires de l'EE lyophilisé et délipidé. Le milieu de base M II (tableau II) est composé de SP, 20 p. 100 ; SUF, 20 p. 100 ; solution de Hanks, 60 p. 100. Dans les autres milieux, 30 p. 100 de la solution de Hanks sont remplacés par différentes préparations d'EE : EE frais, EE lyophilisé, EE lyophilisé et délipidé, EE lyophilisé, délipidé et ultracentrifugé pendant quatre heures à $173\,000 \times g$. Les résultats de cette série sont représentés dans le tableau II.

TABLEAU II.

MILIEU n°	COMPOSITION DU MILIEU		NOMBRE de cultures	VALEUR MOYENNE (lecture photométrique)	DÉVIATION individuelle moyenne
	Milieu de base (70 p. 100)	Complément (30 p. 100)			
I	SP 20 p. 100, SUF 20 p. 100, sol. Hanks 30 p. 100.	EE frais.	28	61	± 18
II	<i>Id.</i>	Sol. Hanks.	25	44	± 7
III	<i>Id.</i>	EE lyophilisé.	17	70	± 18
IV	<i>Id.</i>	EE lyophilisé, délipidé à l'éther.	14	49	± 5
V	<i>Id.</i>	EE lyophilisé, délipidé au benzène.	13	50	± 23
VI	<i>Id.</i>	EE lyophilisé, délipidé au benzène, centrifugé.	20	36	± 15

Malgré des déviations individuelles importantes, les différences de croissance dans les divers milieux se dégagent assez nettement. L'effet de l'EE sur les cultures privées de ce facteur pendant huit jours est évident. L'EE lyophilisé se montre équivalent à l'EE frais. La délipidation au benzène diminue dans une certaine mesure la valeur de l'EE ; après délipidation à l'éther, son activité est réduite à rien. Nous confirmons ici en partie les résultats de Davidson et collab. [41].

L'ultracentrifugation diminue encore davantage l'effet stimulant de l'EE ainsi traité (lyophilisé et délipidé). Il faut pourtant remarquer que le surnageant de cette ultracentrifugation associé

au milieu de base montre encore une activité considérable (comparer M VI et M II).

Dans la *deuxième série expérimentale* nous avons soumis à l'ultracentrifugation tous les constituants macromoléculaires du milieu, l'EE aussi bien que le sérum. D'autre part, nous avons voulu établir si l'action enzymatique d'une masse considérable de tissu vivant sur le milieu à la température de l'étuve ne ferait pas passer, au moins partiellement, les éléments nutritifs actifs contenus dans ce milieu de la fraction macromoléculaire à la fraction micromoléculaire. Pour cela, nous faisons incuber parallèlement un milieu complet type (SP, 20 p. 100 ; SUF, 20 p. 100 ; EE 30 p. 100 ; solution de Hanks, 30 p. 100) pendant quatre heures à 37° C en présence d'une pulpe embryonnaire fraîche. La pulpe est obtenue par découpage (et non par broyage) de tissu embryonnaire. Cette incubation fait baisser le pH du milieu. On le ramène à la valeur de 7,4 à l'aide de carbonate de sodium. Nous donnons les résultats de cette série dans le tableau III.

TABLEAU III.

MILIEU n°	COMPOSITION du milieu	NOMBRE de cultures	VALEUR moyenne	DÉVIATION individuelle moyenne
I.	SP 20 p. 100, SUF 20 p. 100, EE 30 p. 100, sol. Hanks 30 p. 100.	14	35	± 9
II.	Milieu n° I ultracentrifugé.	16	8	± 2
III.	Milieu n° I incubé 4 h. avec pulpe embryon- naire fraîche.	20	20	± 8
IV.	Milieu n° III ultracentri- fugé.	16	6	± 3
V.	SP 20 p. 100, SUF 20 p. 100, sol. Hanks 60 p. 100	12	10	± 3
VI.	Milieu n° V ultracentri- fugé.	6	9	± 2

Dans cette expérience, comme dans la précédente, le rôle de l'EE apparaît clairement. Sa présence dans le milieu fait au moins tripler en six jours la quantité de matière nucléoprotéinique colorable au bleu de toluidine. L'ultracentrifugation du milieu complet abaisse sa valeur d'une façon beaucoup plus considérable que ne le fait l'ultracentrifugation de l'EE seul (voir fig. 1 et 2). L'incubation en présence de pulpe tissulaire diminue la valeur nutritive du milieu complet. Par ailleurs, l'ultracentrifugation de ce milieu montre qu'il n'est pas plus riche en éléments micromoléculaires actifs que le milieu préparé à base d'EE

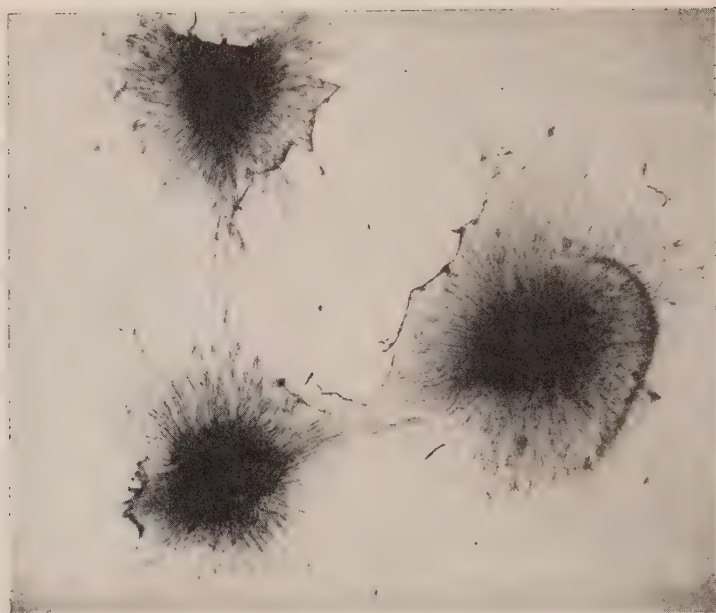


FIG. 1. — Culture des fibroblastes d'embryon de poulet en milieu complet (SP 20 p. 100, SUF 20 p. 100, EE 30 p. 100, solution de Hanks 30 p. 100). Quatrième jour de culture.



FIG. 2. — Culture des fibroblastes d'embryon de poulet en milieu complet (le même que pour la figure 1) mais centrifugé pendant quatre heures à 173 000 $\times g$. Quatrième jour de culture.

habituel. On ne peut évidemment affirmer ceci que sous réserve : il n'est pas exclu en effet que cette incubation fasse accumuler simultanément dans le milieu des catabolites dont l'action nocive l'emporterait.

Bien que la différence des résultats en milieux V et VI (milieux à base de sérums seuls [sans EE], avant et après centrifugation), telle que nous la lisons photométriquement, ne soit pas significative, l'examen des préparations montre une certaine migration et une certaine croissance en milieu V, opposées à une croissance pratiquement nulle en milieu VI.

Dans la *troisième série expérimentale* nous associons au milieu de culture, dans le but d'enrichir la fraction micromoléculaire en éléments actifs (Fischer), un EE préparé d'après la méthode préconisée par cet auteur. Les deux extraits sont délipidés au benzène. Dans le milieu VI un EE frais les remplace partiellement.

D'autre part, nous essayons de compléter avec du sérum dialysé un milieu appauvri en certaines fractions macromoléculaires à la suite de l'ultracentrifugation. Dans le tableau IV nous donnons parallèlement pour les milieux I, II, III et VI les deux estimations de croissance décrites plus haut : l'une par lecture photométrique

TABLEAU IV.

MILIEU n°	COMPOSITION DU MILIEU	NOMBRE de cultures	MESURE directe		MESURE du colorant extrait	
			Valeur moyenne	Dévi- ation individuelle moyenne	Valeur moyenne	Dévi- ation individuelle moyenne
I	Milieu de base: SP 30 p. 100, EE lyophilisé 20 p. 100, EE Fischer 20 p. 100 additionné de 30 p. 100 de sol. de Hanks.	23	40	± 8	81	± 17
II	Milieu de base comme dans le n° I, ultracentrifugé, additionné de 30 p. 100 de sol. de Hanks.	20	46	± 5	46	± 14
III	Milieu de base comme dans le n° I, ultracentrifugé, additionné de 20 p. 100 de sérum dialysé et de 10 p. 100 de sol. de Hanks.	31	27	± 8	64	± 11
IV	Sérum dialysé 20 p. 100, Sol. de Hanks 80 p. 100.	23			46	± 5
V	Sol. de Hanks 100 p. 100.	8			46	± 3
VI	SP 30 p. 100, EE lyophilisé 15 p. 100, EE Fischer 15 p. 100, EE frais 10 p. 100 additionné de 30 p. 100 de sol. de Hanks.	32	44	± 12	86	± 15

directe des préparations colorées, l'autre par colorimétrie du bleu de toluidine extrait par l'acide chlorhydrique normal.

Les différences entre les milieux complets I et VI d'une part, et tous les autres d'autre part, sont significatives avec les deux méthodes d'estimation. Ainsi la masse des nucléoprotéines, et par conséquent la masse de matière vivante, augmente en milieu complet approximativement du simple au double par rapport à celle des cultures témoins, laissées en solution de Hanks avec ou sans sérum dialysé. En milieu complet ultracentrifugé nous obtenons des résultats analogues à ceux de la série précédente : la migration des fibroblastes est peu importante et cette fois, grâce à la mesure du colorant élué correspondant à la masse effective de tissu, nous pouvons affirmer que dans ce milieu, appauvri en grosses molécules, il ne se produit aucune augmentation de la quantité de matière vivante. Des cultures poursuivies dans ce milieu montrent la présence de cellules vivantes isolées au bout de quinze jours ; la culture est entièrement nécrosée au bout de dix-neuf jours ; l'addition à ce milieu (ultracentrifugé) de sérum dialysé, qui par lui-même n'assure aux cultures témoins qu'une croissance insignifiante, améliore d'une façon considérable sa valeur (milieu III).

★ ★

Nous avons établi par analyse [Kjeldahl] (2) l'effet de l'ultracentrifugation sur la teneur du milieu en protéines. Un milieu complet type (SP, 35 p. 100 ; EE, 25 p. 100 ; solution de Hanks, 40 p. 100) contient avant la centrifugation 3,16 mg/cm³ d'azote total et 2,66 mg/cm³ d'azote protidique. L'EE représente dans ces valeurs respectivement 0,27 mg/cm³ et 0,17 mg/cm³ d'azote. La plus grande quantité d'azote de ce milieu appartient donc au sérum. Après l'ultracentrifugation le même milieu contient 2,33 mg/cm³ d'azote total et 1,78 mg/cm³ d'azote protidique. La perte d'azote à l'ultracentrifugation se chiffre donc par 0,83 mg/cm³ ; elle est due entièrement, comme il fallait s'y attendre, à l'appauvrissement du milieu en protéines. Cette perte est beaucoup plus importante que l'apport total en protéines de l'EE. Il faut donc l'imputer, en grande partie, à la sédimentation d'une fraction macromoléculaire du sérum.

Cette conclusion est entièrement confirmée par les résultats de l'ultracentrifugation analytique effectuée à la vitesse de 50 000 t/min., qui correspond pour le rotor utilisé à 182 000 $\times g$, donc à une force centrifuge qui dépasse celle que nous avons employée pour fractionner nos milieux.

(2) Nous tenons à remercier ici M^{lle} Jane Weber pour l'aide qu'elle nous a aimablement apportée dans l'exécution de ces analyses.

Nous reproduisons quatre séries de diagrammes (*Cf.* planche hors-texte) qui donnent l'image de sédimentation de trois milieux de la dernière série (tableau IV) : milieu VI, diagrammes n° 46 ; milieu I, diagrammes n° 47 ; milieu II, diagrammes n° 48, et aussi d'une solution de SP à 30 p. 100 en liquide de Hanks, diagrammes n° 50. Les prises de vue sont espacées pour chaque milieu de neuf cents secondes, la vitesse et l'accélération sont essentiellement les mêmes pour toutes les centrifugations effectuées. La vitesse de déplacement des maxima locaux des courbes nous permet de calculer les constantes de sédimentation des différentes fractions d'après la formule de Svedberg

$$S = \frac{dx/dt}{\omega^2 x}$$

où dx/dt est la vitesse de ce déplacement en centimètres/seconde, ω la vitesse angulaire du rotor en radians/seconde et x la distance du point considéré à l'axe de rotation en centimètres.

Le calcul de ces coefficients a été effectué sans tenir compte des corrections liées au volume spécifique des substances sédimentées et à la densité du milieu. Dans ces conditions, le calcul nous montre qu'il faut admettre une erreur possible maximum de l'ordre de 15 p. 100.

Les amplitudes des courbes donnent une mesure approximative des gradients relatifs des fractions sédimentées au cours de l'ultracentrifugation.

On peut distinguer, comme nous le voyons, trois fractions que nous nommons A, B et C, dans la solution de sérum à 30 p. 100 en liquide de Hanks et dans le milieu VI, et deux fractions (B et C) dans les milieux I et II. Dans le milieu II la fraction B (la plus lourde) est à peine perceptible.

Nous donnons dans le tableau V les valeurs des constantes de sédimentation des trois fractions dans les milieux centrifugés.

TABLEAU V.

MILIEUX	FRACTIONS		
	A	B	C
Sérum de poule à 30 p. 100 en liquide de Hanks.	17,3	7,9	5,2
Milieu VI	14,2	8,3	5,8
Milieu I.	—	6,9	4,0
Milieu II	—	7,1	4,9

Si l'on admet que la constante de diffusion (en unités 10^{-7}) est comprise entre les limites de 2,1 et 3,4 (Svedberg [46]), ce qui

nous semble plausible d'après les résultats de Pedersen (*ibid.*) obtenus avec des substances protidiques, on peut indiquer, comme ordre de grandeur du poids moléculaire moyen des fractions du groupe A, le chiffre de 450 000. Pour des fractions du groupe B, dont la constante de sédimentation varie entre 6,9 et 7,9, on pourrait d'une façon analogue attribuer à leur poids moléculaire une valeur comprise entre 100 et 200 000. De même, on peut admettre pour les fractions C un poids moléculaire compris entre 60 et 90 000. A titre de comparaison, rappelons que d'après Pedersen (*ibid.*), la constante de sédimentation des séroglobulines de l'homme est de 7,1 et celle des sérum-albumines de 4,4.

Nous concluons donc que dans un milieu complet, qui contient du sérum et de l'EE, nous sommes en présence de trois groupes de substances, identifiées par leur vitesse de sédimentation, et par conséquent par leurs poids moléculaires.

La concentration des substances de la fraction A, de poids moléculaire très élevé, est faible, nous n'arrivons même pas à la distinguer dans le milieu complet I. La fraction B, dont la masse moléculaire est de l'ordre de 150 000, est fortement représentée dans le sérum et, par conséquent, dans les milieux complets (I et VI). Elle disparaît presque entièrement (ainsi que la fraction A) dans le milieu ultracentrifugé II, qui perd en même temps une grosse partie de son azote protidique. Parallèlement, comme le montrent les résultats biologiques, ce milieu perd tout pouvoir de faire proliférer, et même de maintenir en vie, à la longue, les tissus cultivés *in vitro*.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Le problème de la nutrition cellulaire *in vitro* ne peut pas être considéré autrement que comme un phénomène d'une grande complexité.

Dans l'aspect que présente la culture cellulaire *in vitro*, la croissance vraie se confond avec la migration cellulaire, et ces deux fonctions distinctes se manifestent différemment pour différents tissus. Nous tentons, dans nos observations, de discerner ces deux fonctions et d'utiliser dans nos cultures un matériel tissulaire uniforme.

D'autre part, nous pouvons estimer la valeur nutritive d'un milieu selon deux points de vue qui sont : a) le maintien de la vie cellulaire ; b) la stimulation de la croissance tissulaire.

Il est évident que la séparation absolue de ces deux aspects de la vie cellulaire *in vitro* ne peut être qu'artificielle. Nous pouvons considérer, en effet, la croissance comme un cas particulier de la vie cellulaire où l'activité anabolique l'emporte sur son catabolisme. Cela n'exclut pas, bien entendu, l'existence

possible de facteurs chimiquement individualisés, stimulant spécifiquement la biosynthèse de la croissance. Dans le cas des tissus dont la cadence de multiplication propre est élevée (tissus embryonnaires) et en présence d'un milieu de départ complet, contenant en abondance tous les éléments considérés comme indispensables pour une croissance rapide, on a le maximum de chances de mettre en évidence les effets de l'élimination de certains de ces facteurs.

Ce sont précisément les conditions que nous avons réalisées au cours de nos expériences. De plus, dans le jugement que nous portons sur la valeur nutritive des différents milieux, nous associons, à la mesure de l'augmentation du volume du tissu, l'estimation de la longueur de la survie cellulaire dans les mêmes conditions.

*
* *

L'ensemble de nos observations nous permet de tirer les conclusions suivantes :

1° L'élimination des substances dialysables des milieux de culture complets (sérum + extrait embryonnaire), quoique diminuant leur valeur, permet aux tissus de réaliser une croissance incontestable en présence des seuls éléments macromoléculaires non dialysables. Cette constatation est valable moyennant deux réserves : a) elle est vraie pour les tissus fraîchement explantés ; b) elle a été établie surtout pour le tissu épithélial.

2° Dans le milieu entièrement privé de protéines qu'est le sérum ultrafiltré, la croissance tissulaire est très réduite. L'appauvrissement des cellules en contenu protoplasmique et l'appauvrissement du protoplasme en nucléoprotéines constitue l'image caractéristique de ces cultures, telle qu'on l'observe sur des préparations colorées. La durée de ces cultures ne dépasse habituellement pas deux semaines. Nous confirmons ici les résultats des auteurs cités [45, 36, 25].

Pour rendre ce milieu utilisable pour une culture prolongée, l'adjonction de sérum normal se montre plus efficace que l'adjonction d'extrait embryonnaire. Rappelons que l'extrait embryonnaire utilisé est environ treize fois moins riche en azote protidique que le sérum.

3° Les résultats de l'ultracentrifugation nous permettent de dégager les constatations suivantes :

A. Pour l'extrait embryonnaire, l'élimination des fractions de poids moléculaire le plus élevé diminue, mais n'annule pas son effet. Les facteurs stimulant la croissance se trouveraient, d'après cette observation, à la fois dans le surnageant et dans la partie sédimentée. Ceci confirme les observations de Fischer [17]. Ce point exige pourtant des éclaircissements supplémentaires.

B. Les expériences où nous soumettons à l'ultracentrifugation le milieu complet, aussi bien l'extrait embryonnaire que le sérum, nous donnent des résultats bien plus nettement tranchés. En soustrayant de ce milieu les protéines d'un poids moléculaire de l'ordre de 150 000 et plus, on entraîne un abaissement brusque de sa valeur nutritive. Un milieu, qui assurait avant la centrifugation une croissance abondante et rapide, réduit cette croissance à zéro après la sédimentation de certains composants macromoléculaires, ce qui correspond à une perte de 30 p. 100 environ de l'azote protidique. La disparition d'une fraction de l'extrait embryonnaire en est en partie responsable, comme nous le montrent les résultats précédents. Il semble pourtant que l'élimination massive des fractions du sérum de poids moléculaire élevé (fractions A et B, voir planche et tableau V) soit la cause principale de cet arrêt pratiquement complet de la croissance. Les observations faites précédemment sur la culture en sérum ultrafiltré, et en sérum ultrafiltré complété avec un sérum normal, renforcent cette supposition. Rappelons que le temps de survie en milieu ultracentrifugé et celui en milieu ultrafiltré sont sensiblement les mêmes.

Cette constatation nous conduit à envisager plusieurs explications possibles :

a) Elimination d'une fraction protidique de base, par elle-même chimiquement (nutritivement) non essentielle, mais jouant un rôle primordial en tant que tampon protecteur dans les échanges chimiques cellule-milieu.

Cette possibilité est à admettre à la lumière des résultats positifs que nous obtenons en complétant le milieu ultracentrifugé avec du sérum dialysé.

b) Elimination d'un facteur essentiel du point de vue nutritif. Les fractions sédimentées pourraient contenir des fonctions chimiques indispensables dont la biosynthèse par les cellules en culture *in vitro*, complète et suffisamment rapide, serait impossible.

c) Il se peut également que les fractions sédimentées ne présentent qu'un support colloïdal sur lequel sont adsorbés les facteurs indispensables à la croissance tissulaire, eux-mêmes de poids moléculaire beaucoup moins élevé.

Il est vraisemblable qu'en employant l'ensemble des techniques dont nous nous sommes servis dans ce travail : culture sur support chimiquement inerte, emploi de tissus précultivés dans un milieu dépourvu de facteurs de croissance, mesure photo-électrique de la croissance, ultracentrifugation et autres techniques de fractionnement, il sera possible d'apporter sur ces points de nouvelles précisions.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] L. E. BAKER et A. CARREL. *J. exp. Med.*, 1926, **44**, 397.
- [2] G. BARSKI et J. MAURIN. *Ces Annales*, 1948, **74**, 312.
- [3] G. BARSKI, J. MAURIN et M^{lle} O. CROISSANT. *Ces Annales*, 1949, **76**, 1.
- [4] G. BARSKI et P. MANIGAULT. *Ces Annales* (sous presse).
- [5] A. CARREL. *J. exp. Med.*, 1912, **15**, 516.
- [6] A. CARREL et A. H. EBELING. *J. exp. Med.*, 1923, **38**, 487.
- [7] A. CARREL et A. H. EBELING. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, 1142.
- [8] A. CLAUDE. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1938, **39**, 398.
- [9] A. CLAUDE, *Science*, 1938, **87**, 467.
- [10] J. N. DAVIDSON et C. WAYMOUTH. *Biochem. J.*, 1943, **37**, 271.
- [11] J. N. DAVIDSON et C. WAYMOUTH. *Biochem. J.*, 1945, **39**, 188.
- [12] B. EPHRUSSI et G. TEISSIER. *Arch. exp. Zellforsch.*, 1933, **13**, 1.
- [13] B. EPHRUSSI. *C. R. Acad. Sci.*, 1931, **192**, 1763.
- [14] W. R. EARLE et J. W. THOMPSON. *Publ. Health Rep.*, 1930, **45**, 2672.
- [15] V. J. EVANS et W. R. EARLE. *J. Nat. Canc. Inst.*, 1947, **8**, 103.
- [16] A. FISCHER. *Nature*, 1939, **144**, 113.
- [17] A. FISCHER. *Acta Physiol. Scand.*, 1941, **3**, 54.
- [18] A. FISCHER et T. ASTRUP. *Pflügers Arch.*, 1943, **247**, 34.
- [19] A. FISCHER, T. ASTRUP, G. EHRENSVARD et V. OEHLENSCHLAGER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1948, **67**, 40.
- [20] A. FISCHER. *Exp. Cell. Res.*, 1949, Suppl. I, 430.
- [21] J. H. HANKS. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1948, **31**, 235.
- [22] J. H. HANKS et R. E. WALLACE. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1949, **74**, 196.
- [23] E. HENRIOT et E. HUGUENARD. *C. R. Acad. Sci.*, 1925, **180**, 1389.
- [24] R. S. HOFFMAN et L. DOLJANSKI. *Growth*, 1939, **3**, 61.
- [25] L. L. LAYTON et H. TUTELMAN. *Am. J. Hyg.*, 1949, **50**, 1.
- [26] P. LÉPINE, P. NICOLLE et J. GIUNTINI. *Ces Annales*, 1942, **68**, 503.
- [27] P. LÉPINE. *Bull. Soc. Philom.*, 1944-1945, **125**, 257.
- [28] P. LÉPINE, G. BARSKI et J. MAURIN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **73**, 252.
- [29] M. R. LEWIS et N. H. LEWIS. *Anat. Rec.*, 1911, **5**, 277.
- [30] M. R. LEWIS et N. H. LEWIS. *Contrib. to Embryol.*, 1934, **25**, 161.
- [31] M. J. A. DES LIGNERIS. *Arch. exp. Zellforsch.*, 1936, **18**, 442.
- [32] L. G. LONGSWORTH. *J. Am. Chem. Soc.*, 1939, **61**, 529.
- [33] E. MARGOLIASH, E. TENENBAUM et L. DOLJANSKI. *Growth*, 1948, **12**, 1.
- [34] L. MICHAELIS. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1947, **12**, 131.
- [35] J. K. MOEN. *J. exp. Med.*, 1935, **61**, 247.
- [36] H. R. MORGAN et R. W. WISEMAN. *J. Infect. Dis.*, 1946, **79**, 131.
- [37] J. F. MORGAN, H. J. MORTON et R. C. PARKER. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1950, **73**, 1.
- [38] R. C. PARKER. *J. exp. Med.*, 1936, **64**, 121.
- [39] E. G. PICKELS. *J. Gen. Physiol.*, 1943, **26**, 341.
- [40] K. R. PORTER, A. CLAUDE et E. F. FULLAM. *J. exp. Med.*, 1945, **81**, 233.
- [41] K. K. SANFORD, W. R. EARLE et G. D. LIKELY. *J. Nat. Canc. Inst.*, 1948, **9**, 229.
- [42] G. SCHRAMM. *Koll. Zeitschr.*, 1941, **97**, 106.

- [43] E. L. SCHILLING, W. R. EARLE et V. J. EVANS. *J. Nat. Canc. Inst.*, 1950, **40**, 883.
- [44] H. S. SIMMS. *Science*, 1936, **83**, 418.
- [45] H. S. SIMMS et M. SANDERS. *Arch. Path.*, 1942, **33**, 619.
- [46] T. SVEDBERG et K. O. PEDERSEN. *The Ultracentrifuge*, Clarendon Press, Oxford 1940.
- [47] R. TENNANT, A. A. LIEBOW et K. G. STERN. *Proceed. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 1941, **46**, 18.
- [48] H. J. TRURNIT. *Science*, 1950, **111**, 1.
- [49] J. VERNE. 1949. Communic. personnelle.
- [50] J. WIRTH et G. BARSKI. *Ces Annales*, 1947, **73**, 987.
- [51] J. WIRTH, P. ATANASIU, G. BARSKI et M^{lle} O. CROISSANT. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 827.
- [52] P. R. WHITE. *Growth*, 1946, **10**, 231.
- [53] P. R. WHITE et E. LASFARGUES. *Proceed. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 1949, **71**, 479.
- [54] G. P. WRIGHT. *J. exp. Med.*, 1926, **43**, 591.

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

Diagrammes de sédimentation des différents milieux de culture de tissu.

Les abscisses des courbes correspondent aux distances de l'axe de rotation (x), les ordonnées représentent les gradients de l'indice de réfraction $\left(\frac{dn}{dx}\right)$ qui sont proportionnels aux gradients de concentration.

Les photos *a* sont prises au moment où la centrifugeuse atteint la vitesse de 50 000 t/min. Les photos *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, sont prises respectivement à quinze, trente, quarante-cinq, soixante, soixante-quinze minutes, à partir de ce moment. Les maxima des courbes correspondent aux différentes fractions. C'est leur vitesse de déplacement qui est à la base des calculs des constantes de sédimentation (voir texte). La sédimentation progresse de droite à gauche.

La fraction lourde A est visible sur les diagrammes 50a, 46a. Elle n'est pas représentée sur les diagrammes *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, sa sédimentation étant complète après quinze minutes.

La fraction moyenne B est représentée partout, sauf dans la série 48 où elle a été éliminée presque entièrement par ultracentrifugation préalable. On voit toutefois un léger maximum à l'emplacement de la fraction B, l'élimination n'étant pas complète. La fraction C présente partout la concentration relative la plus élevée.

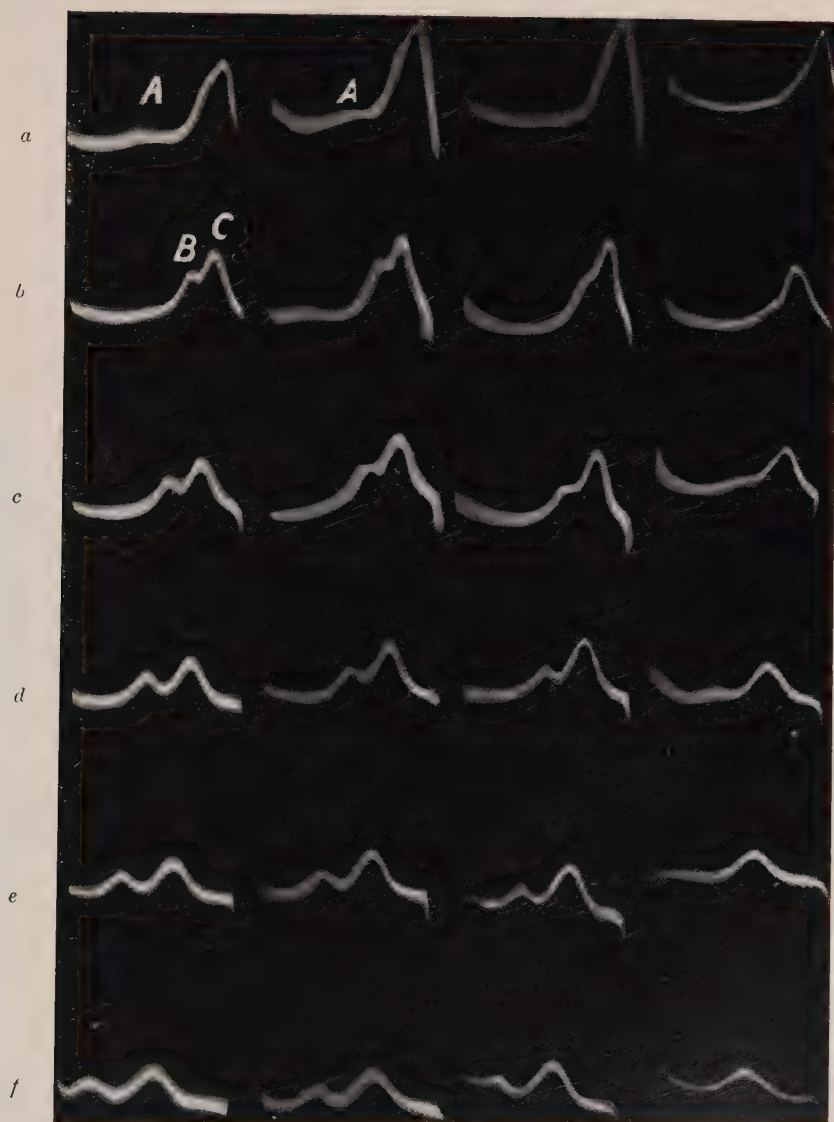
Les images prises au même moment pour les milieux analogues (par exemple les images 50^d, 46^d, 47^d) ne sont pas strictement superposables, comme on devrait s'y attendre pour les fractions ayant une même constante de sédimentation (par exemple la fraction B dans les milieux I et II, diagrammes 47 et 48) et pour des expériences conduites de manière identique. Ce phénomène est certainement dû aux légères différences de vitesse de rotation et de temps d'accélération entre les expériences successives.

50

46

47

48



METHODE PHOTOMÉTRIQUE D'ÉVALUATION DE CROISSANCE TISSULAIRE *IN VITRO* EN CULTURE SUR MEMBRANES PLASTIQUES

par GEORGES BARSKI et PIERRE MANIGAULT (*).

(*Institut Pasteur, Service des Virus* [D^r P. LÉPINE].)

L'évaluation quantitative de la croissance des tissus animaux cultivés *in vitro* présente des difficultés toutes spécifiques, si on la compare avec la mesure relativement facile de la croissance microbienne ou protozoaire.

Si on définit avec Cunningham et Kirk [9] la croissance tissulaire *in vitro* comme un accroissement de la « matière vivante », on s'apercevra que les méthodes de mesure de cette croissance pratiquées jusqu'ici ne sont pas satisfaisantes. Elles manquent surtout de tenir compte de la non-homogénéité des cultures et des différences importantes dans la constitution des tissus et des cellules, de leur épaisseur et de leur richesse en matière protéique.

La méthode la plus ancienne et la plus utilisée, sans doute pour sa facilité, est celle de la mesure de la surface. Cette méthode ne tient pas compte de la densité cellulaire par unité de surface. Or, la distribution et la densité moyenne de la matière vivante dans une colonie cellulaire *in vitro* changent considérablement en fonction des conditions de culture et, en particulier, en fonction de la présence des facteurs de croissance dans le milieu. Autrement dit, elles caractérisent, au moins autant que la surface, les valeurs que nous voulons habituellement mettre en évidence par une mesure. Laser [16] l'a démontré d'une façon irréfutable en comparant la surface et le poids sec des cultures aux différents stades de leur développement. D'après cet auteur, c'est l'accroissement de la « densité » de la culture et non pas de sa surface, qui est, en premier lieu, responsable de l'augmentation de son poids.

Cunningham et Kirk [9] ont proposé de perfectionner cette méthode, en associant à la mesure de la surface la numération

(*) *Société française de Microbiologie*, séance du 5 avril 1951.

des cellules, la mesure de l'épaisseur moyenne de la culture et de la taille moyenne des cellules. Mais Cunningham lui-même admet que malgré tous les soins qu'il a apportés à sa méthode, celle-ci n'arrive pas à donner une image fidèle de l'accroissement réel de la culture. Cet auteur souligne en particulier les variations considérables de densité protoplasmique même dans une seule culture, variations qui échappent à la mesure qu'il propose.

Une autre méthode couramment utilisée est basée sur la numération des mitoses. Sa valeur est également très relative. Le nombre des mitoses décelées dans une culture à un moment donné dépend de nombreux facteurs, dont certains n'ont aucun rapport avec la croissance. Des substances nuisibles et même toxiques à longue échéance peuvent instantanément accroître le nombre des mitoses. Mais même dans les conditions normales de culture, la cadence des divisions cellulaires varie largement (Lewis et Lewis [17], Willmer [21]). D'après certaines indications les mitoses se produisent dans la culture par vagues. Par conséquent, le nombre de mitoses décelées par rapport à la surface ou au nombre total des cellules est soumis au hasard et donne une mesure souvent très inexacte de la croissance tissulaire.

L'estimation de la croissance par le poids sec constitue tout naturellement une méthode fastidieuse et chargée, en plus, des grosses erreurs liées à la masse très faible de tissu en culture. Elle ne donne aucun renseignement concernant le caractère de la croissance et l'état du tissu.

La méthode de mesure de l'activité respiratoire a l'avantage de permettre des mesures successives sur la même culture. Elle présente pourtant de sérieux inconvénients : les cultures doivent se faire dans des conditions spéciales très différentes des conditions normales de culture. En outre, la valeur de cette activité respiratoire ne peut pas être considérée, *a priori*, comme proportionnelle à la masse de substance vivante : la croissance peut se produire dans des conditions aérobies aussi bien qu'en anaérobiose (Laser [15]) ; il est donc impossible d'interpréter avec une certitude suffisante les résultats d'une telle mesure.

Mentionnons enfin une méthode proposée par Berenblum, Chain et Heatley en 1939 [3], réalisée d'abord par Willmer [22] et ensuite, sur une large échelle, par Davidson et Weymouth [10, 11]. Elle repose sur un dosage du phosphore des nucléoprotéines présentes dans le tissu cultivé. Le principe de cette méthode semble excellent, mais telle que l'ont réalisée ces auteurs, elle soulève certaines réserves : la masse du tissu est toujours très réduite, ce qui ramène la mesure vers la limite de l'erreur propre au dosage et, de plus, la méthode de culture sur plasma qu'emploient ces auteurs introduit des erreurs supplé-

mentaires, qui ne semblent pas être négligeables, vu l'importance de la masse du plasma par rapport à la masse du tissu.

Pour conclure, on peut affirmer que nous ne disposons pas, à l'heure actuelle, d'une méthode satisfaisante d'évaluation de croissance tissulaire *in vitro*.

La méthode que nous proposons, bien qu'elle ne soit pas exempte de défauts, réalise pourtant, à notre avis, un progrès réel. Elle donne une approximation bien plus proche de la valeur de la matière vivante dans les cultures individuelles que les méthodes jusqu'ici employées; elle est relativement facile à exécuter et permet de réaliser rapidement un grand nombre de mesures sur des préparations de cultures dont les caractéristiques rappellent celles d'une coupe histologique et qui se prêtent en même temps à un examen microscopique détaillé.

Le principe de cette méthode consiste à mesurer photo-électriquement les nucléoprotéines contenues dans les cultures colorées électivement par un colorant basique. Elle est appliquée aux cultures effectuées sans plasma sur membranes plastiques. Dans ces cultures, après un lavage soigné, précédant la fixation, le seul élément pratiquement colorable est le tissu.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE.

Davidson et ses collaborateurs [13] ont prouvé l'ubiquité des acides nucléiques non seulement dans le noyau, mais aussi dans le protoplasme des cellules animales. Pour les fibroblastes cultivés *in vitro*, Davidson, Lesli et Waymouth (*ibid.*) ont trouvé un rapport
$$\frac{\text{acide ribonucléique}}{\text{acide désoxyribonucléique}}$$
 allant de 2,5 : 1 à 4 : 1.

Ce rapport évolue dans le sens d'une augmentation de l'acide ribonucléique (protoplasmique) et à cause de son augmentation absolue lorsque les conditions de nutrition cellulaire sont favorables.

D'autres auteurs comme Brachet [5], Caspersson [6], Caspersson et collab. [7] et Norberg [19] ont démontré que la teneur en acide ribonucléique du protoplasme peut augmenter dans certaines limites parallèlement à l'accroissement de la synthèse des protéines.

En conclusion, on peut admettre avec Berenblum, Chain et Heatley [3], Cunningham et Kirk [9] et Davidson et Waymouth [10], que la teneur de la culture en nucléoprotéines caractérise suffisamment bien la quantité de matière vivante dans cette culture, avec cette réserve pourtant, que la corrélation de ces deux valeurs ne peut pas être regardée strictement comme une fonction simple. Les valeurs nucléoprotéiques des cultures en développement rapide sont, en effet, exaltées par l'accroissement

spécifique en acides ribonucléiques qui caractérise ces cultures.

Le dosage photomicroélectrique direct des nucléoprotéines sur des préparations histologiques colorées ou non a été pratiqué par Caspersson [8], par Pollister et Ris [20] et d'autres auteurs, mais il n'a jamais été, à notre connaissance, appliqué aux tissus cultivés *in vitro*. Il faut en voir la raison probablement dans l'obstacle apporté par le plasma dans les cultures de type classique.

L'emploi du bleu de toluidine comme colorant spécifique et électif des nucléoprotéines et son application éventuelle à des estimations quantitatives a été étudié par Michaelis [18]. Si on colore une coupe de tissu avec une solution aqueuse concentrée (1 p. 100) de ce colorant et qu'on lave cette préparation d'abord à l'eau, ensuite à l'alcool jusqu'au moment où le colorant ne s'extraît plus, on peut considérer la quantité de bleu de toluidine, lié par le tissu, comme proportionnelle à sa teneur en nucléoprotéines. Jeener et Brachet [14] en apportent la certitude par des mesures effectuées sur des frottis d'acide ribonucléique pur et de levures. Les déterminations de ces auteurs portent sur des quantités d'acides nucléiques de l'ordre de 100 μ g ou de 1 mg de levures.

Le bleu de toluidine, lié spécifiquement aux nucléoprotéines, présente, d'après Michaelis [18], pour les préparations montées dans l'eau, deux bandes d'absorption : une bande (α) à 630 m μ , qui correspond au colorant à l'état monomoléculaire et une autre (β) à 590 m μ , qui est due à l'absorption par le bleu de toluidine polymérisé. La déshydratation de la préparation à l'alcool fait disparaître la bande et déplace toute l'absorption vers la zone de 630 ; ce déplacement est, du reste, perceptible à l'œil nu.

Le caractère monochromatique de cette absorption persiste quand on monte les préparations au baume du Canada après passage par un bain de toluène.

La propriété spécifique des nucléoprotéines colorées au bleu de toluidine de donner, après déshydratation, une bande unique d'absorption correspondant au colorant à l'état monomoléculaire, a été mise à profit dans notre méthode.

Nous avons décrit ailleurs les détails de la méthode de culture des différents tissus sur membranes plastiques [1, 2]. Rappelons seulement que les cultures se font sur des lamelles de 18 x 18 mm recouvertes de la membrane de formvar, dans des alvéoles de 1 cm² de surface environ, formées par des anneaux de verre. Nous plaçons d'une façon symétrique 3 ou 4 cultures par alvéole, à une distance maximum l'une de l'autre. Un soin spécial est apporté à l'explantation des fragments de dimension et d'épaisseur égales. Nous avons procédé au découpage, à partir des

tissus précultivées, de fragments de 1 mm² environ avec des instruments spéciaux aux lames tranchantes interchangeables, sous contrôle d'une loupe binoculaire. Nous pensons que des améliorations peuvent encore être apportées, sur ce point délicat et important, pour confectionner des fragments strictement comparables, par exemple à l'aide d'un emporte-pièce. Les différences individuelles entre fragments, que nous notons avec notre technique actuelle, sont réduites en moyenne à 25 p. 100. Pour effectuer une seule estimation de mesure, nous employons 20 à 30 cultures. Mais on peut facilement augmenter ce chiffre, vu la simplicité relative de culture et la rapidité de la mesure.

Toutes les cultures d'une série expérimentale sont fixées au Bouin-Duboscq-Brasil simultanément, au moment choisi, après un lavage très soigné à l'eau physiologique chauffée à 37° C. Les cultures peuvent rester dans le fixateur pendant plusieurs jours. Elles sont ensuite lavées d'abord à l'alcool à 96° et ensuite à l'eau lithinée jusqu'à disparition de la coloration jaune de l'acide picrique du fixateur. La coloration au bleu de toluidine (1 p. 100 en solution aqueuse), filtré directement avant l'usage, se prolonge pendant quarante-cinq minutes. La différenciation d'abord à l'eau et ensuite à l'alcool à 96°, jusqu'à la disparition des dernières traces de colorant dans les bains, dure environ une heure et demie. On procède alors à la déshydratation avec de l'alcool absolu et du toluène et au montage au baume, en recouvrant d'une autre lamelle la lamelle portant les cultures. L'ensemble est monté sur une lame porte-objet ordinaire qui porte le numéro de la préparation. Après un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve, les préparations sont prêtes pour la lecture.

Il existe de nombreux montages permettant la colorimétrie et la photométrie des préparations microscopiques. Celui que nous avons effectué n'a que le mérite de la simplicité. Le microscope (Koritska) possède une tête photographique incorporée dans le statif et préréglée de telle façon que la mise au point soit toujours la même pour l'œil et pour la pellicule photographique. Nous avons substitué à l'appareil de prise de vues une cellule à couche d'arrêt reliée à un galvanomètre convenable.

Notre microscope est muni d'un objectif Zeiss 2,5 × et d'un oculaire de projection 8 ×. Grâce à cette combinaison optique, nous arrivons à placer en entier une culture dans le champ du microscope. L'élément photoélectrique est une cellule au sélénium à couche d'arrêt de type LMT 3 001 A d'usage courant. Le galvanomètre AOIP a été choisi pour ses commodités de lecture.

Un jeu de miroirs dans le statif du microscope permet de faire l'observation en même temps que la mesure. 30 p. 100 du flux

étaient dirigés vers les yeux, et 70 p. 100 environ vers la cellule. Il est possible également de diriger la totalité du flux successivement sur les yeux de l'observateur et sur la cellule (voir figure). Cette commodité offre l'avantage de pouvoir comparer très rapidement le fond de la préparation à l'objet de la mesure et on peut s'assurer ainsi que la lumière transmise par le fond a toujours la même intensité pendant un intervalle de temps considéré. Cette stabilité contrôlée de la source nous dispense de faire un

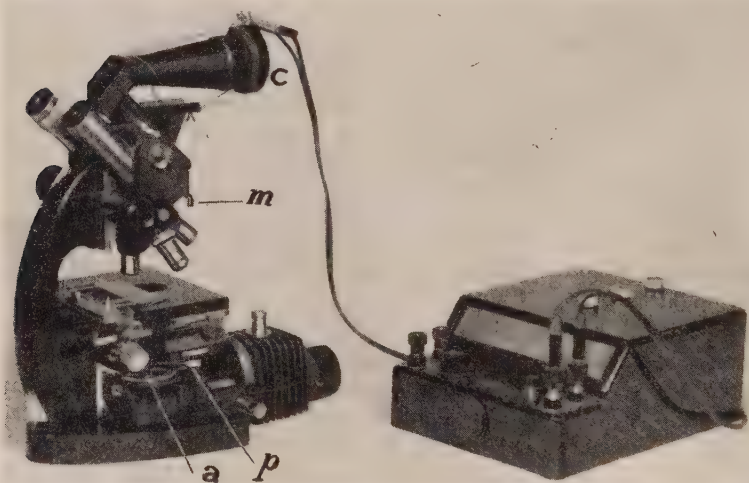


FIG. 1. — Dispositif de mesure photomicroométrique de la croissance tissulaire *in vitro*. *a*, analyseur; *p*, polariseur; *m*, commande du miroir réfléchissant la totalité du flux lumineux vers la cellule; *c*, cellule photoélectrique à couche d'arrêt.

montage à deux cellules en opposition. Il faut seulement s'astreindre à observer le fond à des intervalles assez rapprochés et à ajuster l'intensité du flux lumineux pour que la déviation du spot du galvanomètre dans ces conditions soit toujours la même. Pour ce réglage, on dispose de deux polaroïdes montés en-dessous de la platine. La rotation de l'un d'eux suffit à assurer le réglage d'intensité lumineuse indépendamment de la longueur d'onde. Nous employons une lumière monochromatique obtenue grâce à un écran jaune.

Pour la position de la source et de son diaphragme de champ, comme pour la position du condenseur et de son diaphragme d'ouverture, nous employons les réglages connus sous le nom d'éclairage de Köhler. C'est dans ces conditions que la direction

des rayons lumineux, lors de la traversée de la préparation, sera correcte. Alors l'estimation du rapport de la lumière incidente, transmise par le fond de la préparation (lamelles, lames, baume du Canada, impuretés diverses) à la lumière incidente transmise par l'objet, donne une représentation satisfaisante de la masse tissulaire en épaisseur comme en surface.

Le point zéro pour chaque mesure est établi, comme nous l'avons dit, sur un champ libre de la préparation. Il correspond au flux lumineux maximum et se traduit par la position limite maximum du spot lumineux du galvanomètre, dont l'échelle a 150 divisions. La différence entre ce chiffre et la lecture faite après l'introduction de l'objet dans le champ correspond directement à la valeur de l'absorption lumineuse due au bleu de toluidine fixé par la masse tissulaire. On peut utiliser ces chiffres directement comme donnant une valeur relative de la quantité de matière vivante colorable présente dans la culture. On peut également calculer le coefficient de croissance C pour chaque culture :

$$C = \frac{A_0 - A_x}{A_0 - A_1}$$

où A_0 sera la valeur maximum lue sur le fond libre de la préparation, A_x la lecture obtenue pour la culture donnée et A_1 la moyenne des lectures pour des fragments explantés fixés et colorés avant toute croissance.

Nous avons employé la méthode décrite plus haut au cours d'une série d'expériences, dont les résultats sont publiés ailleurs [2]. Leur but a été l'évaluation, du point de vue de leur valeur pour la croissance tissulaire, des différentes fractions obtenues par ultracentrifugation des milieux complexes (sérums, extraits embryonnaires, solution physiologique).

Nous avons pu obtenir, au cours de ces expériences, des chiffres concordants et, dans la dernière série où nous avons apporté un soin spécial à explanter des fragments de taille comparable, nous obtenons des résultats où les différences moyennes entre les cultures parallèles sont de l'ordre de ± 25 p. 100. Cette marge est suffisamment étroite pour que les différences de valeur nutritive des milieux étudiés se détachent clairement, comme nous le voyons d'après les données du tableau I, que nous citons comme exemple.

Pour vérifier la valeur de notre méthode et surtout pour s'assurer à quel point l'augmentation de la zone tissulaire colorée, responsable de l'absorption lumineuse, correspond à un accroissement réel de la substance vivante des cultures, et non pas à une migration, nous avons procédé à une modification de cette méthode qui est la suivante. Les préparations, une fois

TABLEAU I. — Résultats comparatifs des valeurs d'extinction correspondant aux cultures individuelles, obtenus directement avec le montage microscope - cellule photoélectrique - galvanomètre et indirectement par photométrie du colorant extrait des cultures avec du HCl N.

MILIEUX	NOMBRE de cultures	MESURES directes		MESURE du colorant extrait	
		valeur moyenne	déviati moyenne	valeur moyenne	déviati moyenne
Milieu complet (sérum homologue, extraits embryonnaires séchés et délipidés, solution physiologique) .	23	40	± 8	81	± 17
Milieu complet ultra-centrifugé pendant quatre heures à 173 000 X g. .	20	16	± 5	46	± 14
Milieu centrifugé complété avec du sérum dialysé .	31	27	± 8	64	± 11
Milieu complet, additionné de l'extrait embryonnaire frais	32	44	± 12	86	± 15

soumises à la mesure décrite plus haut, sont démontées dans un bain de toluène et ensuite réhydratées (bains d'alcool absolu, d'alcool à 96° et d'eau). Chaque préparation est ensuite plongée pour une heure dans un bain de 5 ml d'acide chlorhydrique normal. Dans ces conditions, le colorant se dissocie des nucléoprotéines de la culture et passe entièrement en solution (Jenner et Brachet, 1940). Nous procédons ensuite au dosage du bleu de toluidine élué au photomètre de Beckman, muni d'une lampe à hydrogène, en utilisant la longueur d'onde de 630 m μ .

Une comparaison de ces résultats parallèles montre une équivalence suffisante de ces deux méthodes. Elle prouve que l'augmentation de l'extinction à la lecture directe suit assez fidèlement l'augmentation réelle de matière nucléoprotéinique dans les cultures.

En employant la méthode que nous proposons, il est nécessaire de se rendre compte de toutes les sources d'erreurs qu'elle comporte et que nous essayons d'analyser.

I. La source principale d'erreurs, sur laquelle nous avons déjà insisté, est due à l'inégalité des fragments de tissu au départ de la culture. Comme il est impossible d'exécuter plusieurs mesures avec la même culture, le seul moyen d'y remédier consiste à égaliser le plus possible les dimensions de ces fragments et surtout à multiplier le nombre des cultures parallèles

pour chaque estimation. Il y a lieu de faire remarquer que l'erreur due aux différences de taille des fragments au départ se confond avec les différences individuelles de croissance tissulaire qui existent toujours et qui dépendent de facteurs non contrôlables.

II. Dans nos mesures, nous admettons que l'absorption de lumière par la culture obéit à la loi de Beer-Lambert, c'est-à-dire qu'elle est proportionnelle à la quantité de matière absorbante dans la préparation. Or, nous savons que cette règle cesse d'être valable pour des concentrations très élevées du colorant. De telles concentrations pourraient être atteintes à l'intérieur d'explants excessivement épais. Dans ce cas, une migration à partir des fragments serait susceptible d'augmenter l'absorption lumineuse sur la périphérie de la culture sans la diminuer d'autant dans son centre. Mais, en réalité, en opérant avec des tissus pré-cultivés sur membranes plastiques, donc très bien étalés en couche mince, nous évitons, ou nous réduisons considérablement cette erreur. La preuve en est apportée par les mesures photo-électriques parallèles du colorant extrait des préparations (voir tableau).

III. On pourrait chercher d'autres sources d'erreurs dans l'adsorption du colorant sur la préparation en dehors des nucléoprotéines de la culture. Il faut également admettre qu'il se produit dans l'objet une certaine absorption de lumière qui n'est pas due au colorant, ainsi qu'une réflexion et dispersion partielles de cette lumière. On peut supposer pourtant que ces pertes de lumière sont faibles par rapport à l'absorption spécifique due au colorant associé aux nucléoprotéines. De plus, l'adsorption non spécifique du colorant, ainsi que les pertes secondaires de lumière, sont en général, elles aussi, proportionnelles à la masse tissulaire ; elles s'alignent donc en conséquence sur l'extinction principale.

Remarquons finalement que la méthode que nous venons de décrire, aussi bien par mesure directe que dans sa modification basée sur la mesure photométrique du colorant élué, pourrait être étendue à d'autres colorations et en particulier à des colorations différentielles pour les dosages de constituants déterminés du tissu cultivé, tels qu'acides désoxy- et ribonucléiques, lipides et autres.

RÉSUMÉ.

Nous décrivons une nouvelle méthode de mesure de croissance des tissus cultivés *in vitro* par détermination photomicroélectrique d'absorption de lumière traversant une préparation fixée et colorée d'une culture.

Cette méthode s'applique aux cultures tissulaires effectuées

sans support plasmatique sur membranes plastiques incolores.

Le tissu est coloré électivement au bleu de toluidine et la mesure, effectuée après une différenciation appropriée, donne essentiellement la valeur des nucléoprotéines présentes dans la culture.

Une modification de cette méthode, consistant à mesurer la quantité du colorant adsorbé par le tissu et ensuite élué, peut servir comme moyen de contrôle.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. BARSKI et J. MAURIN. *Ces Annales*, 1948, **74**, 312.
- [2] G. BARSKI, J. MAURIN, G. WIELGOSZ et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1951, **81**, 1.
- [3] I. E. BERENBLUM, E. CHAIN et N. G. HEATLEY. *Biochem. J.*, 1939, **33**, 68.
- [4] J. BRACHET. *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 88.
- [5] J. BRACHET. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1947, **12**, 18.
- [6] T. CASPERSSON. *Naturwissen.*, 1941, **29**, 33.
- [7] T. CASPERSSON, H. LANDSTROEM-HYDEN et L. AQUILONIUS. *Chromos.*, 1941, **2**, 111.
- [8] T. CASPERSSON. *Scand. Arch. Phys.*, 1936, **73**, supp. 8, 1.
- [9] B. CUNNINGHAM et P. L. KIRK. *J. Cell. a. Comp. Phys.*, 1942, **20**, 343.
- [10] J. N. DAVIDSON et CH. WAYMOUTH. *Biochem. J.*, 1943, **37**, 27.
- [11] J. N. DAVIDSON et CH. WAYMOUTH. *Ibid.*, 1945, **39**, 188.
- [12] J. N. DAVIDSON et CH. WAYMOUTH. *Ibid.*, 1946, **40**, 568.
- [13] J. N. DAVIDSON. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1947, **12**, 50.
- [14] K. JEENER et J. BRACHET. *Enzym.*, 1943-45, **11**, 222.
- [15] H. LASER. *Biochem. Zeitschr.*, 1933, **264**, 72.
- [16] H. LASER. *Zeitschr. Krebsforsch.*, 1933, **39**, 384.
- [17] W. H. LEWIS et M. R. LEWIS. *Anat. Rec.*, 1917, **13**, 259.
- [18] L. MICHAELIS. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1947, **12**, 131.
- [19] B. NORBERG. *Acta Phys. Scand.*, 1943, **5**, Suppl. 14.
- [20] A. W. POLLISTER et H. RIS. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1947, **12**, 147.
- [21] E. N. WILLMER. *J. Exp. Biol.*, 1933, **10**, 340.
- [22] E. N. WILLMER. *Ibid.*, 1942, **18**, 237.

**A PROPOS DE QUELQUES CAS DE RÉACTIONS LOCALES
DITES « ACCÉLÉRÉES »,
CONSÉCUTIVES A LA VACCINATION
PAR VOIE INTRADERMIQUE AVEC DU BCG
CONGELÉ-DESSÉCHÉ**

par V.-M. OPPERS (*).

(Du Service de Santé du Gouvernement d'Indonésie,
chargé de la vaccination au BCG [Bandoung, Java].)

Depuis que Foley et Parrot eurent introduit, en Afrique du Nord, la méthode de vaccination au BCG sans tuberculination préalable, plusieurs observations ont été publiées concernant les réactions au BCG dites « accélérées ». Il s'agit de réactions locales consécutives à une vaccination au BCG chez des sujets déjà allergiques à la tuberculine ; ce phénomène ne doit pas être confondu avec le « diagnostic-test » de Ustvedt ou avec le « phénomène de Willis ».

Dans un article paru dans les *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie* (1950, **28**), Foley et Parrot, comparant l'inoculation intradermique de BCG et la vaccination par scarifications, attirent l'attention, une fois de plus, sur l'existence de ces réactions « accélérées ».

De leur côté, Lacroix et Antoine ont décrit quelques cas dans *Algérie Médical*, 1948, **5**. Ces deux derniers auteurs ont vu qu'une tuberculination et une vaccination au BCG effectuées simultanément peuvent produire une réaction locale identique trois ou quatre jours plus tard. La réaction à la tuberculine s'éteint après le huitième jour, alors que la réaction locale au BCG continue d'évoluer normalement.

Au cours de la campagne de vaccination au BCG qu'il m'a été donné d'effectuer dans l'île de Timor (Indonésie), j'ai vacciné environ 30 000 sujets sans tuberculination préalable. J'ai eu alors l'occasion de contrôler minutieusement deux groupes, composés de 371 et de 214 personnes respectivement, pour déceler, parmi elles, d'éventuelles réactions « accélérées ».

Le vaccin utilisé au cours de cette campagne a été le vaccin

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 avril 1951.

BCG congelé-desséché de l'Institut Pasteur de Paris. Les ampoules de ce vaccin sec contiennent chacune 150 mg de BCG dans du glucose ; le contenu de chaque ampoule fut dilué dans 150 ml d'eau physiologique et, de cette dilution, chaque sujet reçut 0,1 ml par voie intradermique à la face interne de l'avant-bras gauche.

Dans le premier groupe de 371 sujets, nous avons pratiqué simultanément une réaction de Pirquet à la vieille tuberculine au bras droit et la vaccination intradermique au BCG au bras gauche. Toutes précautions étaient prises pour empêcher la tuberculine d'être introduite au point d'inoculation du BCG : on attendait que la tuberculine fût sèche, ce qui, à la température tropicale, prend peu de temps, et l'endroit du Pirquet fut ensuite couvert d'un pansement à la gaze hydrophile. L'âge de ces sujets variait de 0 à 61 ans ; le contrôle des réactions locales eut lieu soixante-douze heures plus tard.

78 sujets eurent une réaction BCG accélérée et une Pirquet positive.

262 sujets eurent une réaction BCG normale et une Pirquet négative.

29 sujets eurent une réaction BCG accélérée et une Pirquet négative.

2 sujets eurent une réaction BCG normale et une Pirquet positive.

Les deux dernières personnes, âgées de 51 et de 60 ans respectivement, présentaient une atrophie cutanée prononcée. Dans des cas de ce genre, il est extrêmement difficile d'injecter dans le derme la quantité voulue de vaccin et les deux sujets en question avaient certainement reçu les $\frac{2}{3}$ seulement de la dose normale. Cela peut expliquer pourquoi, malgré une Pirquet positive, la réaction locale au BCG ne fut pas accélérée chez eux. Nous voyons que parmi les 371 personnes prises au hasard composant ce premier groupe, la réponse locale au BCG va dans le même sens que la réaction de Pirquet chez 340 d'entre elles.

Chez 29 on voit une réaction au BCG accélérée bien que la Pirquet fût négative. En rapportant ce chiffre au nombre total des réactions accélérées ou positives observées, on peut en déduire une sensibilité de la réaction locale au BCG de 27 p. 100 supérieure à celle de la réaction de Pirquet.

Ces 29 sujets ont été ensuite éprouvés par une réaction de Mantoux, tous les quatre jours, aux dilutions de tuberculine au 1/10 000, au 1/1 000 et au 1/100 successivement :

6 d'entre eux eurent une réaction de Mantoux positive au 1/10 000,

9 d'entre eux eurent une réaction de Mantoux positive au 1/1 000,

14 d'entre eux eurent une réaction de Mantoux positive au 1/100.

Nous pourrions en conclure, sous toute réserve, que la sensibilité allergique mise en évidence par la réaction accélérée au BCG pourrait être comparée à celle décelée par la réaction de Mantoux au 1/100.

Le deuxième groupe de 214 était composé entièrement de sujets ayant présenté une réaction accélérée au BCG, que j'ai pu suivre entièrement jusqu'à la disparition des phénomènes locaux. Afin d'exclure toute éventualité d'erreur, les personnes composant ce groupe ne furent pas éprouvées à la tuberculine simultanément avec l'inoculation de BCG, pour éviter toute influence de la tuberculine sur la réaction locale au BCG ou de contamination du point d'inoculation du BCG par la tuberculine. Ce danger paraît d'ailleurs être entièrement théorique, car les 214 réactions accélérées au BCG de ce deuxième groupe se sont comportées de la même manière que les 107 observées parmi les 371 personnes du premier groupe ayant présenté, elles aussi, des réactions accélérées et qui avaient été tuberculinisées simultanément avec la vaccination.

Voici comment nous pouvons résumer l'évolution de la réaction accélérée au BCG.

Dans quelques cas, il s'est produit, quelques heures après la vaccination, une infiltration rouge diffuse autour du point d'inoculation (11 cas sur 214). Chez un seul sujet, une lymphangite se produisit vingt-quatre heures après l'inoculation, légèrement douloureuse mais sans hypertrophie décelable des glandes satellites ; cette lymphangite disparut en quarante-huit heures sans traitement. Chez tous les autres sujets la réaction locale accélérée atteint son acmé soixante-douze heures après l'inoculation du BCG ; elle se caractérise par de la rougeur, de l'infiltration et de la chaleur au point d'inoculation, et on voit quelquefois une ou plusieurs petites papules. L'infiltration peut atteindre plus de 30 mm de diamètre (nous en avons vu 4 de 35 mm de diamètre). Chez 7 personnes, l'infiltration prit la forme d'un petit disque plat, entièrement couvert de très fines papules, aux bords nettement délimités, comme une pièce de monnaie. Les bords ne sont pas surélevés et l'épaisseur du disque semble être environ de 2 mm.

Le cinquième jour tous ces phénomènes perdent leur caractère aigu, les papules tendent à confluer là où elles existent ; leur contenu est un liquide trouble grisâtre ; il n'y a jamais de suppuration. Le sixième jour, les papules se dessèchent et l'infiltration a quasiment disparu. Contrairement à ce qui se passe après une inoculation de BCG chez un sujet non allergique, où l'infiltration et éventuellement un petit ulcère se forment seulement au cours

de la troisième ou quatrième semaine, l'infiltration caractéristique du BCG éventuellement accompagnée d'ulcération se produit, chez les sujets présentant une réaction accélérée, entre le huitième et le dixième jour. Ensuite l'évolution de la réaction vaccinale ne se distingue en rien, chez les sujets à réactions accélérées, de celles que présentent les sujets normaux ; l'infiltrat définitif du BCG consécutif à une réaction accélérée se reconnaît seulement à une légère desquamation, trace des papules, persistant plusieurs semaines. Cela permet de reconnaître, même tardivement, les sujets qui ont présenté une réaction accélérée.

Le tableau I donne un aperçu de la taille des infiltrations et de la présence des papules, constatées au quatrième jour après la vaccination et rangées d'après les âges.

TABLEAU I. — Réaction accélérée, quatre jours après vaccination.
Infiltration en millimètres.

AGE	NOMBRE	3 A 5 MM	6 A 10 MM	11 A 15 MM	16 A 20 MM	21 A 25 MM	26 A 30 MM	31 A 35 MM	PAPULES
0 à 5	4	0	0	4	0	0	0	0	2
6 à 10	42	8	16	5	1	10	0	2	19
11 à 15	10	4	4	1	1	0	0	0	4
16 à 20	18	0	2	9	5	2	0	0	10
21 à 30	44	2	11	13	12	5	1	0	21
31 à 40	48	0	12	19	15	2	0	0	19
41 à 50	33	3	4	10	10	4	0	2	13
51 à 60	11	0	1	4	3	1	2	0	3
61	4	0	3	1	0	0	0	0	1
Total	214	17	53	66	47	24	3	4	92

La lecture de ce tableau nous apprend que dans 190 cas parmi les 214 (88 p. 100), la réaction accélérée a mesuré de 6 à 25 mm ; elle était donc plus facile à lire que la réaction à la tuberculine. Il y eut, en outre, 92 cas (43 p. 100) présentant des papules.

Nous avons suivi ces sujets afin de nous rendre compte de l'évolution ultérieure de la réaction locale accélérée et des complications éventuelles. Nous avons pu ainsi constater en premier lieu qu'aucune complication sérieuse ne s'est produite chez les personnes ayant présenté une réaction accélérée au BCG : ni lymphangite, ni abcès, etc. Par la suite, l'évolution de la réaction locale ne se distingue en rien (sauf la légère desquamation) de celle qu'ont présentée 2 000 personnes appartenant à un groupe témoin, elles aussi suivies longtemps, et qui toutes avaient été trouvées négatives à la tuberculine avant la vaccination au BCG. Nous avons donc, huit à douze semaines après la vacci-

nation, comparé le nombre d'infiltrats mesurant plus de 10 mm et d'ulcères dépassant 6 mm s'étant produits dans les deux groupes.

TABLEAU II. — Pourcentage des infiltrations et ulcérations huit à douze semaines après vaccination BCG

	INFILTRATIONS de 10 mm et au-dessus	ULCÉRATIONS de 6 mm et au-dessus	TOTAL	POURCENTAGE
Contrôle vaccination chez 2 000 anergiques	34	204	238	11,9
214 sujets présentant une réaction BCG accélérée .	5	21	26	12,1

S'il est vrai que le nombre de sujets observés n'est pas très grand, je suis néanmoins convaincu qu'il suffit, pour montrer sans ambage qu'en ce qui concerne les réactions locales au BCG, rien n'empêche de vacciner au BCG les sujets déjà allergiques à la tuberculine, au cours des campagnes de vaccination en masse, comme celle effectuée dans l'Île de Timor. En d'autres termes, on a le droit, en Indonésie, de pratiquer la vaccination au BCG congelé-desséché par voie intradermique, sans tuberculination préalable.

En résumant, nous pouvons dire que, d'une part, la réaction locale accélérée au BCG traduit une sensibilité allergique comparable à celle décelée par une réaction de Mantoux au 1/100, et, d'autre part, qu'elle ne comporte, en comparaison avec 2 000 témoins non allergiques préalablement, aucun danger accru de complication.

En vue de ces observations, nous croyons pouvoir recommander le remplacement des campagnes de dépistage par tuberculine par des campagnes de vaccination au BCG, le jour où, en Indonésie, de nouvelles observations, s'ajoutant aux nôtres, auront démontré l'innocuité absolue de la vaccination BCG ainsi effectuée parmi les populations de ce pays. S'il en est ainsi, la vaccination au BCG serait en même temps un moyen de dépistage et un moyen préventif. En effet, les vaccinés présentant des réactions locales évoluant après les délais normaux n'auraient pas besoin d'être pris sous contrôle ; seuls les vaccinés ayant présenté une réaction locale accélérée au BCG auraient besoin d'être examinés aux rayons et éventuellement pris sous contrôle. Ainsi, au cours des campagnes de vaccination en masse projetées en Indonésie pour les années 1951-1952, on obtiendrait une immense économie en heures de travail, donc en frais de personnel et de déplacement.

SUR DES LÉSIONS TESTICULAIRES PROVOQUÉES CHEZ LE COBAYE PAR ISO- ET AUTO-SENSIBILISATION

par GUY VOISIN, ALBERT DELAUNAY et MARY BARBER (*)

(*Institut Pasteur.*)

INTRODUCTION.

Au cours de ces dernières années, différents auteurs (Ph. A. Cavelti, E. A. Kabat, etc.) sont parvenus, en injectant chez des animaux (rats, cobayes, singes) des extraits ou de la pulpe d'organes *homologues* (rein, cerveau, cœur) en mélange avec des toxines bactériennes ou des substances adjuvantes (type Freund), à provoquer d'importantes lésions inflammatoires dans l'organe correspondant [par exemple, dans le rein après injection d'extrait rénal, dans l'encéphale après injection de matière cérébrale] (1). Ils ont admis que les lésions ainsi produites étaient de nature allergique, autrement dit qu'elles résultaient d'une sensibilisation de l'organisme vis-à-vis de ses propres tissus.

La portée de telles recherches est évidente. En effet, si le mécanisme mis en cause est exact, rien n'interdit de penser qu'il intervient également chez l'homme. Du même coup, pour nombre d'affections humaines dont l'étiologie est encore fort obscure (glomérulo-néphrites, maladie de Bouillaud, certaines encéphalomyélites), on entrevoit une pathogénie nouvelle et non moins séduisante. Dans des conditions qui resteraient à préciser, notre organisme deviendrait allergique à l'égard de certains de ses constituants. Ainsi prendrait naissance un véritable état d'*auto-allergie* qui donnerait lieu à toutes les perturbations, humorales et tissulaires, qui évoluent sur terrain allergique. En somme, le fait nouveau est ici le suivant : l'allergène ne serait pas de provenance extérieure, il ne serait pas constitué par exemple par une albumine étrangère (microbienne ou autre) ; il serait au contraire

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 avril 1951.

(1) Sur cette question de l'auto-sensibilisation, nous venons d'écrire une revue générale qui paraîtra dans la *Revue d'Immunologie*. Elle apportera au lecteur une bibliographie à peu près complète.

formé dans l'organisme lui-même et représenté par un élément normal (ou à peine modifié) de celui-ci.

Mais le mécanisme invoqué de la sorte mérite-t-il, dès aujourd'hui, d'être considéré comme suffisamment démontré ? Les preuves expérimentales fournies par les auteurs étrangers suffisent-elles à entraîner la conviction ? Pour affirmer la *nature allergique des lésions* qu'ils ont observées, Cavelti, Kabat, etc., ont surtout fait état de leur localisation qui, effectivement, est assez remarquable. C'est ainsi qu'après injection d'extrait de rein, c'est dans le rein qu'on décèle les lésions les plus nettes. On retrouverait ainsi ce qui se passe, du point de vue pathologique, lorsqu'un animal a été traité par un sérum spécifique anti-organe (par exemple production d'une néphrite chez le lapin par injection d'un sérum anti-rein de lapin). Pourtant, il faut bien ajouter qu'on n'a pas encore découvert, pour établir de manière indiscutable l'existence d'un état auto-allergique, des modifications humorales absolument caractéristiques. Plusieurs auteurs ont recherché, dans le sérum des animaux apparemment sensibilisés à leurs propres tissus, la présence d'*auto-anticorps*. Le plus souvent, les résultats obtenus ont été négatifs ou du moins discutables. Au mieux, l'existence d'auto-anticorps aurait pu être établie en mettant en œuvre la réaction de déviation du complément mais celle-ci, on le sait bien, n'est pas toujours étroitement spécifique.

Depuis de longs mois, nous nous sommes intéressés nous-mêmes au problème de l'auto-sensibilisation et, en ce domaine, nous avons réalisé un très grand nombre d'expériences (2). Nous voudrions exposer brièvement ici celles que nous avons faites alors que nous cherchions à provoquer chez le cobaye des lésions testiculaires. Les résultats qu'elles ont fournis ont été tout à fait inattendus ; ils n'en paraissent pas moins remarquables.

A notre connaissance, aucun auteur étranger n'a tenté, jusqu'à présent, d'obtenir des lésions du testicule par injection, chez l'animal, d'extraits testiculaires homologues. Un tel essai, cependant, avait de quoi séduire pour plusieurs raisons.

a) Une orchidectomie unilatérale est une opération qui n'offre aucune difficulté. Il devient, dans ces conditions, très simple de sensibiliser un animal à des extraits de son propre testicule, de réaliser par conséquent une véritable *auto-sensibilisation* (alors que, dans leur immense majorité, les cas déjà étudiés se rapportaient plutôt à des phénomènes d'*iso-sensibilisation* (3)).

b) La mise en évidence d'auto-anticorps pouvait, par ailleurs, être facilitée. Par ponction du déférent, on recueille le plus sou-

(2) Elles seront rapportées, *in extenso*, dans la thèse de Doctorat ès sciences de l'un de nous (G. Voisin).

(3) Iso-antigènes mais, naturellement, auto-anticorps.

vent sans peine un grand nombre de spermatozoïdes. Comment se comporteraient ces cellules isolées, vivantes, dès qu'elles seraient placées dans le sérum d'un animal soumis à une auto- ou à une iso-immunisation ? Seraient-elles agglutinées ? lysées ? La preuve humorale, recherchée jusqu'alors si péniblement, risquait cette fois d'être aisément obtenue.

c) Ajoutons encore que, dans un travail généralement oublié de nos jours [4], Metalnikoff a rapporté qu'il était parvenu à rendre le sérum du cobaye spermotoxique en injectant chez cet animal ses propres spermatozoïdes. Cette toxicité accrue du sérum n'était-elle pas due à une production d'auto-anticorps ? A la lumière des données récentes, le fait n'apparaissait pas improbable.

d) Une autre raison justifiait enfin des expériences sur le testicule. Des anticorps croisés ont été décrits pour le testicule et pour le cerveau. Or, les lésions cérébrales, compte tenu de toutes les observations publiées, comptent parmi les plus faciles à provoquer par injection d'extraits de l'organe homologue.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES.

Toutes nos expériences ont eu lieu chez des cobayes mâles, pesant de 250 à 400 g. Au total, 148 animaux ont été utilisés. Les uns étaient neufs. Les autres avaient servi au préalable pour le contrôle d'innocuité des anatoxines, mais l'injection de ces vaccins n'avait, en aucune manière, altéré leur bonne santé.

PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES : *Observations faites chez des cobayes qui avaient reçu, en injection, des extraits de testicules de cobaye en mélange avec des substances adjuvantes (iso-immunisation).*

A. TECHNIQUE. — 28 cobayes ont reçu sous la peau de l'abdomen une ou plusieurs injections (0,5 ml ou 1 ml) de la préparation suivante :

Broyat testiculaire	6 g
Eau physiologique	2 ml
Falba	4 ml
Huile de paraffine	2 ml
Poudre de BK bovins	4 mg

Pour obtenir cette préparation, nous avons opéré ainsi : a) Des testicules prélevés chez des cobayes étaient débarrassés de l'albuminée et broyés au mortier dans un peu d'eau physiologique. Une pulpe très homogène était toujours recueillie. b) Falba, huile de paraffine (4) et poudre de BK bovins (bacilles tués par la chaleur)

(4) L'huile de paraffine, fluide et purifiée, qui nous a servi nous avait été obligeamment fournie par les laboratoires Substantia.

forment, par leur ensemble, ce qu'on appelle les substances adjuvantes de Freund. Le Falba, corps apparenté à la lanoline, joue ici le rôle d'une substance hydrophile émulsionnante. c) Broyat testiculaire et substances adjuvantes étaient finalement mélangés dans les proportions indiquées ci-dessus. Ce mélange se présente sous l'aspect d'une crème blanchâtre. Pour l'injecter chez l'animal avec une seringue, il faut obligatoirement exercer une certaine pression.

Les cobayes traités par ce mélange sont morts spontanément ou ont été sacrifiés à des délais variables : vingt-quatre heures, huit jours, quinze jours, vingt et un jours après la première injection. Les réinjections étaient faites tous les huit jours.

Au moment des *sacrifices*, les principaux organes étaient prélevés et, après fixation dans le liquide de Duboscq-Brazil, soumis aux techniques histologiques classiques.

B. RÉSULTATS. — 1° L'injection du mélange extrait de testicules-substances adjuvantes a provoqué *localement*, chez tous les animaux, une réaction inflammatoire considérable et de longue évolution. Il y eut souvent formation d'une fistule qui donnait issue à une matière parfois crémeuse, parfois caséeuse. La diffusion locale de cette réaction tient peut-être en partie à la présence, dans le mélange, d'une forte quantité d'hyaluronidase.

2° Presque dans tous les cas, *l'état général* des animaux est devenu rapidement précaire. A signaler particulièrement un amaigrissement extrême. Le nombre de morts spontanées fut proportionnellement élevé. A l'autopsie, les testicules étaient le plus souvent atrophiés.

3° *Etudes histologiques.*

a) EXAMEN DES TESTICULES. — Il a révélé des lésions extrêmement étendues.

Lésions des tubes séminifères. — Dans quelques cas seulement, ces lésions étaient minimes et se réduisaient à la disparition des spermatozoïdes centro-lobulaires, à un léger bouleversement du bel ordonnancement architectural des cellules-souches.

Plus souvent, ces lésions étaient très nettes (fig. 1) : disparition totale des spermatozoïdes et des spermatides (les cellules les plus évoluées apparaissent ainsi comme les plus fragiles), la lumière des tubes et du *rete testis*, de même que celle de l'épididyme, n'étant plus occupée que par des cellules immatures plus ou moins dégénérées, avec noyaux énormes ou en état de pycnose, éosinophilie et hyalinisation du protoplasme (quelques cellules géantes multinucléées).

Parfois, les lésions testiculaires ont atteint une amplitude encore plus grande (fig. 2). L'équipement cellulaire des tubes séminifères n'est plus alors formé que par une couronne d'éléments périphé-

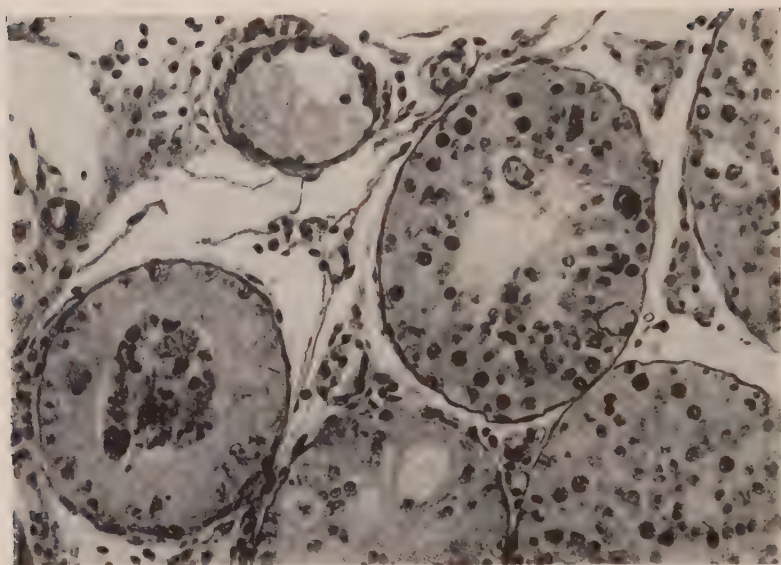


FIG. 1. — Lésions des tubes séminifères observées dans le testicule d'un cobaye traité par des injections du mélange extrait testiculaire-substances adjuvantes. Stade précoce. Faible grossissement. (Photomicrographie P. Manigault.)

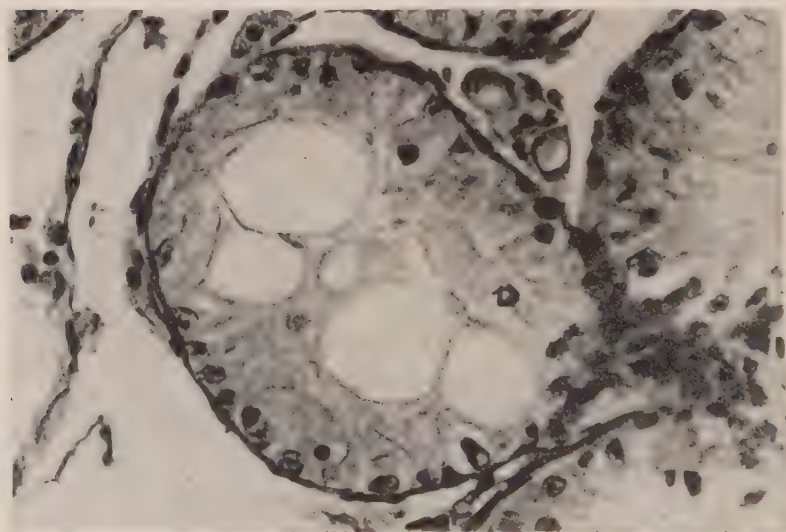


FIG. 2. — Etat d'un tube séminifère observé dans le testicule d'un cobaye traité par des injections du mélange extrait testiculaire-substances adjuvantes. Stade avancé. Fort grossissement. (Photomicrographie P. Manigault.)

riques accolés à la membrane. Ces éléments, en apparence intacts, se caractérisent par un noyau clair avec une chromatine disséminée en fin réseau, deux gros nucléoles bien visibles et une membrane nucléaire crénelée. Malgré cet aspect un peu particulier et leur grand nombre relatif, sans doute sont-ils assimilables à des cellules de *Sertoli*, mais ils rappellent aussi les cellules que Stieve a désignées comme indifférenciées ou dédifférenciées.

Ces éléments curieux sont recouverts par une substance mucoido-filamenteuse colorée en rose par l'éosine et qui s'étend plus ou moins profondément dans la lumière des tubes séminifères. Cette substance est, dans la règle, creusée de grandes vacuoles et renferme parfois des débris cellulaires de toutes sortes. Le plus souvent, l'origine de ces débris ne peut pas être identifiée mais, dans quelques cas, on reconnaît, à certains traits, des spermatides ou des spermatocytes.

En opposition avec ces lésions énormes, on ne trouve généralement dans la membrane propre des tubes que de légères modifications : au plus, léger gonflement des noyaux, faible épaissement de la membrane.

Les lésions que nous venons de décrire, nous les avons trouvées chez *tous* nos animaux d'expérience. Il n'y eut sur ce point aucune exception. Elles existaient déjà dans les testicules prélevés vingt-quatre heures seulement après l'injection du mélange extrait testiculaire-substances adjuvantes. Mais c'est évidemment ici qu'elles étaient le moins marquées. Leur intensité a régulièrement augmenté avec le temps et elle était encore accrue par les réinjections.

Tout le testicule était atteint, mais il n'était pas aussi fortement atteint en tous points. Ici, les lésions étaient légères, là, elles étaient considérables, évoquant ainsi une sorte de répartition segmentaire qui correspondait peut-être à une topographie vasculaire (ou encore tubulaire).

Signalons enfin qu'assez souvent, nous avons trouvé dans le déférent de cobayes, dont les testicules étaient fortement altérés, de nombreux spermatozoïdes vivants et bien mobiles.

Lésions mésenchymateuses. — Vingt-quatre heures après la première injection sous-cutanée de notre mélange chez les animaux, existaient souvent dans la trame conjonctive du testicule de la congestion vasculaire et un peu d'œdème.

Ces modifications, d'abord discrètes, ne tardaient pas à devenir extrêmement importantes. Très différentes sans doute sur le plan histologique, elles n'étaient pas moins étonnantes que les lésions tubulaires que l'on découvrait à leur voisinage ; elles non plus n'ont jamais fait défaut.

Essentiellement, elles se sont caractérisées par une multiplication très nette des cellules conjonctives.

Parfois tout le mésenchyme apparaissait envahi par des histiocytes ; il prenait ainsi l'aspect d'un granulome inflammatoire. Le tissu de Leydig était comme étouffé.

Parfois, la condensation cellulaire était plus localisée. En ce cas, ce qui frappait surtout, c'était l'existence autour des vaisseaux de manchons de cellules : prédominance de lymphocytes auxquels se mêlaient quelques histiocytes. Fait important à noter : nous n'avons jamais constaté d'infiltrations de polynucléaires.

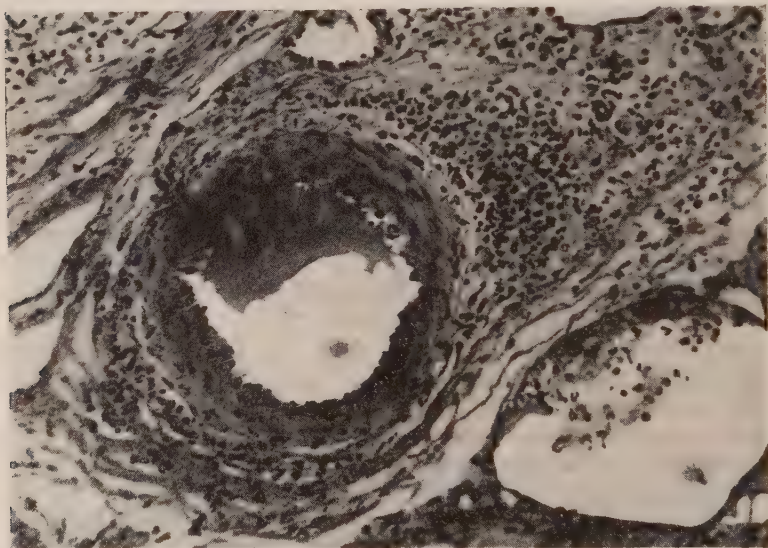


FIG. 3. — Réaction périvasculaire observée dans le testicule d'un cobaye traité par des injections du mélange extrait testiculaire-substances adjuvantes. Stade avancé. Fort grossissement. (Photomicrographie P. Manigault.)

Devant une telle image, il était impossible de ne pas songer aux lésions de la périartérite noueuse (fig. 3).

Sur certaines coupes, une prolifération diffuse des histiocytes existait seule ; sur d'autres, on ne trouvait que des infiltrats périvasculaires. Mais il n'était pas exceptionnel qu'il y eût coexistence de ces deux types de réactions conjonctives.

Ces réactions existaient non seulement dans toute la masse du testicule ; on les découvrait encore — souvent même avec la plus forte intensité — sous l'albuginée et dans l'épididyme.

b) EXAMEN DES AUTRES ORGANES (foie, reins, cœur, cerveau).
Même sur coupes d'organes prélevés chez des animaux sacri-

fiés tardivement, nous n'avons trouvé que des lésions très discrètes. Foie, cœur, cerveau avaient le plus souvent une structure absolument normale. Dans quelques cas seulement, nous avons été frappés par l'importance de la congestion vasculaire dans le rein. Une fois même, nous avons découvert, au sein de cet organe, quelques micro-abcès.

L'intérêt des lésions testiculaires ci-dessus décrites nous paraissant encore renforcé par ces nouvelles données microscopiques, nous avons décidé de nous livrer à une seconde série d'expériences.

SECONDE SÉRIE D'EXPÉRIENCES : *Observations faites chez des cobayes qui avaient reçu, en injection, des extraits de leur propre testicule en mélange avec des substances adjuvantes (auto-immunisation).*

A. TECHNIQUE. — Pour ces nouvelles expériences, nous nous sommes servis également de 28 animaux et nous avons opéré dans des conditions absolument comparables aux précédentes, à cette différence près que le broyat d'organe injecté provenait cette fois du propre testicule du cobaye.

L'orchidectomie avait régulièrement porté sur le testicule gauche (opération aseptique, cela va sans dire) et avait été pratiquée sous anesthésie à l'éther. Ligature du déférent et fermeture de la paroi au fil de lin.

Après l'intervention, testicule et épидидyme prélevés étaient découpés en quatre parties sensiblement égales, enfin déposés dans une boîte de Petri stérile. Celle-ci était placée dans une chambre froide à -15° . Huit à dix jours plus tard, la première fraction testiculaire, retirée de la chambre froide, était broyée dans quelques gouttes d'eau physiologique et cette pâte était injectée, en mélange avec les substances adjuvantes de Freund (et dans les proportions indiquées déjà) chez le cobaye correspondant, par voie sous-cutanée.

Les réinjections, quand elles pouvaient être faites, avaient lieu tous les huit jours. Il y eut au maximum, et pour quelques animaux seulement, 4 injections.

B. RÉSULTATS. — Nous serons très brefs à leur sujet car ils ont été absolument superposables à ceux que nous avait donnés la première série d'expériences.

1° *Aux points d'injection* a pris régulièrement naissance une réaction inflammatoire énorme.

2° *L'état général* des animaux a été rapidement altéré. Les morts spontanées furent nombreuses (environ 50 p. 100).

3° *Etudes histologiques.* Seuls les organes prélevés après saeri-

fice de l'animal ont été examinés, ce sacrifice ayant lieu, selon les cas, vingt-quatre heures, huit jours, quinze jours ou vingt-deux jours après la première injection (fixation, cette fois encore, dans le Duboscq-Brazil).

a) EXAMEN DES TESTICULES. — En tout cas, lésions d'apparence précoce (elles existaient déjà vingt-quatre heures après la première injection), rapidement évolutives, ne manquant presque jamais de devenir considérables et atteignant aussi bien les tubes séminifères que le tissu interstitiel.

La structure normale des tubes séminifères était, dans la règle, complètement bouleversée. La lumière de ces tubes ne renfermait plus de spermatozoïdes. Spermatides, spermatocytes et spermatogonies étaient, pour la plupart, réduits à l'état de débris nécrotiques. Seules, les cellules de Sertoli étaient respectées (elles semblaient même anormalement nombreuses).

Les modifications mésenchymateuses — surtout chez les animaux qui avaient subi plusieurs injections — étaient aussi profondes : dans toute la trame conjonctive existait souvent une prolifération histiocytaire marquée. Plus souvent encore, on pouvait y trouver des infiltrats périvasculaires avec prédominance de lymphocytes.

b) EXAMEN DES AUTRES ORGANES. — *Foie, cœur, cerveau* : pratiquement sains.

Reins : foyers de congestion et même — comme précédemment — quelques micro-abcès.

★★

Compte tenu des résultats fournis par ces deux séries d'expériences, la conclusion, manifestement, s'imposait : il est très facile, en injectant sous la peau du cobaye un broyat testiculaire du même animal en mélange avec des substances adjuvantes, de déterminer dans les testicules des lésions qui se caractérisent à la fois par la rapidité de leur production, leur haute gravité et leur marche progressive (et cela en respectant complètement, ou presque, l'intégrité des autres organes).

Quel est le mécanisme de ces lésions testiculaires ? Comment sont-elles produites ? Sont-elles la conséquence d'une auto-sensibilisation de l'animal ? L'atteinte quasi élective des testicules permettait *a priori* de le penser. Mais ce test anatomique était-il suffisant ? Nous ne l'avons pas cru et c'est dans le dessein de répondre aux différentes questions que nous venons de poser que nous avons fait toute une série d'expériences de contrôle.

TROISIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES : *expériences témoins*.

1° Dans un premier temps, nous avons essayé de déterminer

des lésions testiculaires en injectant chez 13 cobayes un *sérum de lapin antitesticules de cobaye*. Nous voulions, par cette expérience, faire une étude comparative entre des lésions dont l'origine allergique était indiscutable et celles que nous avons décrites jusqu'à présent.

Le sérum de lapin antitesticules de cobaye avait été préparé selon la technique classique. Des testicules de cobaye, libérés de l'albuginée, étaient broyés au mortier dans une petite quantité de Ringer (5 ml de Ringer p. 1 g de tissu). Cette préparation une fois centrifugée à 4 000 tours pendant dix minutes, le liquide surnageant était recueilli. Ce liquide fut injecté à six reprises, chez des lapins, par voie intraveineuse puis intrapéritonéale, à doses croissantes : 1,25 ml, 2,25 ml, 2,50 ml, 10 ml, 14 ml et 30 ml. Un intervalle de trois jours séparait chaque injection. Une semaine après la dernière injection, les animaux survivants (car un certain nombre étaient morts en cours d'immunisation) étaient sacrifiés et leur sérum prélevé.

Ce sérum était riche en anticorps antitesticules de cobaye décelables par les réactions de Kolmer faites avant et après absorption sur hématies de mouton et rein de cobaye (5). Il était aussi spermotoxique. Des spermatozoïdes prélevés dans le déférent de cobayes normaux et déposés dans une goutte du sérum des lapins préparés ont été aussitôt agglutinés et lysés.

Nos sérums de lapins antitesticules de cobayes se sont enfin montrés toxiques pour le cobaye lui-même. Une injection intracardiaque ou intraveineuse (2 ml) a, dans la moitié des cas environ, produit un choc le plus souvent mortel en quelques minutes. Les injections intrapéritonéales (5 ml) ont déterminé, elles aussi, un choc profond mais qui épargnait en général la vie de l'animal.

Ainsi, certains cobayes ont pu recevoir, chaque jour, et pendant trois jours, une injection intrapéritonéale du sérum de lapins immunisés. Vingt-quatre heures après la dernière injection, les animaux ont été sacrifiés et leurs testicules prélevés.

Sur coupes histologiques de ces organes, nous pensions trouver des lésions importantes. Nous avons donc été surpris en ne découvrant que des altérations très discrètes aussi bien au niveau des tubes que du mésenchyme.

Ce premier groupe d'expériences témoins se montrait, du même coup, sans intérêt.

2° Dans un second groupe d'expériences, nous avons recherché si le *sérum* des cobayes soumis aux injections du mélange broyat

(5) Nous tenons à remercier ici nos collègues, MM. Eyquem et Saint-Paul, pour avoir bien voulu nous aider à faire ces réactions.

testiculaire-substances adjuvantes était devenu *toxique* pour les spermatozoïdes de cet animal.

Ici nous avons utilisé les sérums d'animaux ayant déjà reçu plusieurs injections. Ils étaient recueillis par ponction cardiaque ou, plus simplement, par section de la carotide, aussitôt avant l'autopsie.

Dans ces sérums, nous avons placé soit les spermatozoïdes prélevés dans le déférent de l'animal sacrifié lui-même, soit des spermatozoïdes provenant d'un animal neuf. Le sperme avait au préalable été convenablement dilué dans quelques gouttes du liquide suivant :

Glucose	6 g
$\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$	1,2 g
ClNa	0,4 g
POK_2H	0,02 g
OH_2	Q. S. 200 ml

(Ce liquide est satisfaisant pour la conservation des spermatozoïdes.)

Les préparations, entre lame et lamelle, ont été examinées patiemment au microscope. Dans quelques cas, nous avons observé une nette agglutination des cellules, mais ces cas furent exceptionnels. Plus souvent, l'agglutination ne fut que peu marquée. Or, ce phénomène n'est pas rare dans un sérum de cobaye neuf car ce milieu ne convient guère, par lui-même, à l'entretien des cellules mâles.

Pour cette raison, nous avons finalement admis que les sérums des cobayes en expérience n'avaient pas un pouvoir spermotoxique anormalement marqué et nous avons renoncé à rechercher la présence éventuelle d'auto-anticorps par la méthode de Kolmer.

3° Etant donné l'impossibilité où nous nous trouvions de démontrer par voie sérologique l'existence d'un processus auto-allergique chez nos animaux, nous nous sommes décidés, pour essayer de savoir dans quelle mesure les lésions testiculaires observées étaient spécifiques, à recommencer nos expériences de départ mais en changeant la nature de l'antigène tissulaire, plus précisément en remplaçant le broyat testiculaire par des *broyats de foie ou de rein*.

Nous avons donc injecté, chez 40 nouveaux cobayes, un mélange constitué par des substances adjuvantes (type Freund) et par des broyats de foie ou de rein préparés dans des conditions exactement similaires à celles que nous avons adoptées pour l'obtention de la pulpe testiculaire et ajoutés aux substances adjuvantes dans les mêmes proportions. (Précisons seulement que, dans ces cas, il fut toujours question de tentatives d'iso-immunisation.)

Au reste du protocole expérimental, rien ne fut modifié.

Les nouveaux résultats rappelèrent, point par point, ceux que nous avons précédemment obtenus.

a) Fortes réactions locales aux points d'injection ; b) atteinte rapide et profonde de l'état général des animaux qui était au début excellent. Nombreux morts en cours d'expérience ; c) sur les survivants, nous avons prélevé, au moment du sacrifice (qui eut lieu, cette fois encore, vingt-quatre heures, un jour, huit jours, quinze jours et vingt-deux jours après la première injection), le foie, les reins et les testicules. Après fixation dans le Duboscq-Brazil et les manipulations histologiques habituelles, nous avons trouvé sur coupes :

Des lésions toujours discrètes dans le foie et les reins (même après injection de broyats hépatique ou rénal) ;

mais, en revanche, des lésions testiculaires toujours importantes et histologiquement analogues à celles que nous avons découvertes dans nos première et seconde séries d'expériences.

Manifestement, cette nouvelle série tranchait le problème. Si nous ne pouvions pas dire que des extraits de tissus injectés en mélange avec des substances adjuvantes sont incapables de déclencher un processus d'auto-allergie spécifique, du moins pouvions-nous déjà affirmer que ce processus — en admettant qu'il existe — n'était certainement pas responsable de la localisation des lésions observées par nous.

Les lésions testiculaires ici étudiées — le fait ne peut plus être mis en doute — *ne sont donc pas de nature spécifique*.

De quelle nature sont-elles ? Nous reviendrons sur ce point dans notre discussion. Auparavant, nous voudrions rapporter encore quelques résultats expérimentaux.

4° Dans le complexe extrait d'organes-substances adjuvantes, quel est ou quels sont les principes toxiques dont dépendent les lésions testiculaires ? Pour essayer de le savoir, nous avons tenu à faire les expériences suivantes :

a) 8 cobayes ont reçu, à huit jours d'intervalle, deux injections (0,5 ml) d'un broyat testiculaire en eau physiologique (iso-testicule).

Aux points d'injection a pris naissance une réaction inflammatoire assez étendue, assez vive, mais qui cependant n'a jamais conduit à une fistulisation. L'état général est demeuré satisfaisant. Sur coupes des testicules prélevés au lendemain de la seconde injection, nous avons trouvé quelques lésions : disparition des spermatozoïdes centro-lobulaires, quelques cellules en pycnose, mais ces lésions étaient toujours discrètes et ne rappelaient en aucune manière celles que nous avons décrites précédemment.

b) 17 cobayes ont, d'autre part, reçu par voie sous-cutanée

abdominale deux injections des seules substances adjuvantes de *Freund* (dose indentique à celle contenue dans les mélanges substances adjuvantes-extraits d'organes).

Les injections étaient séparées par un espace de huit jours. Les animaux furent sacrifiés vingt-quatre heures après la seconde injection.

Observations : Réactions locales très vives. Altération constante de l'état général des animaux (plusieurs morts spontanées). Sur coupes des testicules, lésions diffuses, importantes, atteignant à la fois les cellules des tubes séminifères (pynose et lyse) et la trame conjonctive (réactions histiocytaïres, périvasculaires ou non). Dans leur ensemble, néanmoins, ces lésions étaient peut-être un peu moins marquées que celles qui avaient fait leur apparition après injection des mélanges broyat testiculaire-substances adjuvantes.

c) 9 cobayes ont reçu, à huit jours d'intervalle, trois injections de la préparation suivante :

Eau physiologique	0,4 ml
Falba.	0,1 ml
Huile de paraffine	0,6 ml

soit une émulsion de substances adjuvantes sans bacilles de Koch.

Ces injections ont provoqué localement une réaction encore sévère, mais elles ont altéré l'état général des animaux moins fâcheusement que les injections précédentes. Sur coupes des testicules prélevés chez des animaux sacrifiés le lendemain de la dernière injection, lésions importantes, étendues, siégeant à la fois dans les tubes et dans la trame, moins violentes cependant que celles provoquées par les substances adjuvantes auxquelles étaient joints des bacilles de Koch.

d) 6 cobayes ont subi une orchidectomie unilatérale puis ont été soumis à deux injections, à huit jours d'intervalle, des substances adjuvantes de *Freund* (sans extraits de tissus).

Observations : Grosses réactions locales, atteinte rapide de l'état général. Importantes lésions testiculaires.

e) Nous avons encore examiné les coupes du testicule droit de 6 cobayes un ou plusieurs jours après l'ablation du testicule gauche sous anesthésie à l'éther.

Sur ces coupes, nous avons pu découvrir quelques lésions tubulaires, mais nous n'avons jamais observé de réactions mésenchymateuses importantes.

f) Ajoutons, enfin, que nous avons étudié, du point de vue histologique, les testicules d'un grand nombre de cobayes qui n'avaient subi aucun traitement, mais qui avaient occupé les mêmes cages que les animaux en expérience. Le plus souvent, ces organes — et aussi bien ceux qui nous avaient été fournis par les orchidec-

tomies — nous ont semblé sains ou, s'ils étaient le siège d'altérations, celles-ci étaient toujours discrètes.

Cela est vrai, du moins, lorsque les testicules ont été prélevés chez des animaux en bonne santé.

Dernière remarque : sans pouvoir affirmer le fait, nous avons eu pourtant l'impression que, de tous nos animaux, ceux qui ont réagi le plus fortement étaient ceux qui avaient d'abord servi au contrôle des anatoxines.

DISCUSSION.

Résumons brièvement, tout d'abord, nos observations.

En injectant chez des cobayes un broyat testiculaire du même animal en mélange avec des substances adjuvantes type *Freund*, nous avons pu, dans 100 p. 100 des cas, déterminer des lésions testiculaires, tant épithéliales que parenchymateuses, qui se caractérisaient à la fois par la rapidité de leur production, leur étendue et leur marche progressive.

De ces lésions, quel est le mécanisme ?

Nous avons pensé d'abord qu'elles étaient la conséquence d'une auto-sensibilisation de l'organisme, autrement dit, que nous avions réussi à reproduire, au niveau des testicules, ce que d'autres auteurs ont réalisé, notamment pour le rein et le cerveau [4]. Le succès apparaissait même d'autant plus remarquable que nous avons pu déclencher ces altérations tissulaires en injectant chez les animaux des extraits de leur propre testicule.

Malheureusement, cette hypothèse, si l'on tient compte de l'ensemble de nos observations, paraît impossible à soutenir.

a) Sur le plan immunologique, nous n'avons pas été capables de mettre en évidence, dans le sérum des cobayes traités, un anticorps antitesticule de cobaye.

b) Par ailleurs, des lésions qui, histologiquement, rappellent point par point celles qui succèdent aux injections du complexe extrait testiculaire-substances adjuvantes, peuvent être produites par des mélanges des mêmes substances avec des extraits de foie ou de rein. Il est évidemment difficile de parler, dans ces conditions, d'une spécificité d'organe.

Ces données anatomiques jointes à l'absence d'un critère immunologique doivent permettre, à notre avis, de trancher nettement la question : les lésions testiculaires observées par nous ne méritent pas d'être considérées comme des lésions allergiques.

Mais peut-on ajouter que nos expériences suffisent à jeter un discrédit sur toutes les recherches qui se sont donné pour objet l'étude des phénomènes d'auto-sensibilisation ? Nous ne le pensons pas davantage. Disons simplement que les testicules de cobaye ne conviennent pas pour l'étude de ces phénomènes.

Sans doute, ne conviennent-ils pas parce qu'ils constituent des organes trop fragiles, trop sensibles. C'est un fait que nous avons pu, avec une facilité surprenante, altérer leur structure.

Ainsi, nous avons été en mesure de provoquer des lésions testiculaires, non seulement avec des mélanges de substances adjuvantes et d'extraits d'organes, mais encore avec des substances adjuvantes isolées (privées ou non de leur teneur en bacilles de Koch) ou de simples extraits de testicules.

Cette action à distance des substances adjuvantes (puisque celles-ci étaient injectées sous la peau de l'abdomen) nous paraît d'ailleurs intéressante à signaler, car elle indique un fait nouveau qui mérite d'être pris en considération par tous ceux qui les utilisent.

Mais revenons à l'étude des lésions testiculaires. Bien souvent déjà, des pathologistes ont été frappés, en examinant des testicules humains ou animaux, par l'étendue des altérations cellulaires qu'ils y découvraient avec surprise. Par ailleurs, les endocrinologistes ne sont pas sans connaître quelles modifications de structure significatives peuvent faire subir aux organes mâles des déséquilibres d'hormones.

Ce dernier fait nous paraît important car il offre l'avantage d'indiquer comment nos injections ont probablement conduit à des dégâts testiculaires aussi étendus.

Ces injections ont *peut-être* déclenché un processus d'auto-sensibilisation ; en tout cas, celui-ci était trop faible pour se traduire nettement par des modifications humorales ou tissulaires spécifiques. En revanche, elles ont *presque certainement* donné lieu à une réaction non spécifique, en troublant l'équilibre endocrinien dans l'organisme des animaux ; en d'autres termes, elles ont dû déterminer un *stress*.

A l'heure actuelle, on ne trouve dans la littérature que peu de données sur les altérations testiculaires au cours des *stress* [2]. Sur ce point, presque tout reste à faire mais une étude de ce genre mérite, à n'en pas douter, d'être systématiquement poussée.

Les lésions lymphocytaires, au cours des réactions d'alarme, ont déjà été maintes fois décrites. Leur existence ne peut plus être discutée. Nous-mêmes nous avons consacré à cette question différents travaux [3].

Or, du point de vue métabolisme, fonctions, on trouve plus d'une analogie entre le tissu testiculaire et le tissu lymphoïde. Il nous paraît donc particulièrement souhaitable de refaire pour celui-là, sur le plan physio-pathologique, ce qui a déjà été fait pour celui-ci avec succès.

Mais c'est précisément le but des nouvelles expériences que nous avons en cours. Quelles sont précisément les lésions testiculaires qui accompagnent, en règle générale, un *stress* ?

RÉSUMÉ.

En injectant sous la peau de cobayes des broyats de testicule du même animal en mélange avec des substances adjuvantes, les auteurs ont pu déterminer des lésions testiculaires, tant épithéliales que parenchymateuses, qui se caractérisaient à la fois par la rapidité de leur production, leur haute gravité et leur marche progressive.

Ces lésions ne paraissent pas traduire le développement chez l'animal d'un processus d'auto-sensibilisation. Elles semblent plutôt la conséquence de réactions non spécifiques. Elles seraient ainsi à rapprocher des altérations lymphocytaires observées au cours des *stress*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] S. METALNIKOFF. Ces *Annales*, 1900, **14**, 577.
- [2] H. SELYE. « *Stress* », 1 vol., 1950.
- [3] A. DELAUNAY, MARCELLE DELAUNAY et JACQUELINE LEBRUN. Ces *Annales*, 1949, **76**, 203.

LES ANTICORPS INCOMPLETS AU COURS DE LA MONONUCLÉOSE INFECTIEUSE

par A. EYQUEM et L. PODLIACHOUK (*).

(*Institut Pasteur.*)

On sait que la réaction de Paul et Bunnell permet, dans un grand nombre de cas, de confirmer le diagnostic de la mononucléose infectieuse ; cependant, cette réaction peut se positiver à des intervalles de temps variés après le début de la maladie, en moyenne du troisième au soixantième jour (Aimsworth, 1940 ; Kaufman, 1944).

Mais, dans certains cas où le tableau clinique et hématologique est pourtant typique, la réaction reste négative ; la proportion de ces réactions négatives varie, suivant les statistiques, de 17 à 30 p. 100. Bien qu'on puisse soutenir que, dans ces cas, le virus en cause soit différent de celui de la mononucléose infectieuse, on pouvait se demander, à la lumière des nouvelles acquisitions dans le domaine de la sérologie des groupes sanguins, si la constatation d'une réaction de Paul et Bunnell négative au cours de syndromes cliniquement et hématologiquement typiques de mononucléose infectieuse ne tenait pas au fait que cette réaction ne permet de détecter que des anticorps agglutinant les globules rouges en suspension dans de l'eau physiologique.

En effet, l'examen des sérums de sujets Rh négatifs iso-immunisés au facteur Rh ne révèle d'anticorps de type anti-Rh que dans 40 p. 100 des cas, si on utilise les anciens procédés de détection, c'est-à-dire l'agglutination des globules rouges suspendus en eau physiologique.

Au contraire, l'utilisation de milieu riche en protéine permet de mettre en évidence des anticorps capables de se fixer sur les globules rouges en suspension dans l'eau physiologique sans les agglutiner et capables d'agglutiner ces mêmes globules rouges en suspension dans de l'albumine de bœuf, par exemple à 18 p. 100. On peut déceler ces mêmes anticorps grâce à la réaction de Coombs, Mourant et Race à l'aide du sérum anti-globuline, le sérum anti-globuline préparé d'une manière convenable

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 avril 1951.

ne pouvant agglutiner que les globules rouges ayant fixé à leur surface les anticorps spécifiques. C'est exclusivement à l'aide de cette technique que l'on peut mettre en évidence les anticorps déterminant les groupes sanguins E^a, D^a, Duffy, etc.

Dans le domaine de la mononucléose infectieuse, déjà en utilisant la technique originelle de recherche des anticorps bloquants, Levine et Gilmour [1] ont observé un sérum de sujet atteint de mononucléose infectieuse présentant un effet bloquant typique vis-à-vis d'agglutinines anti-mouton, c'est-à-dire se fixant sur les globules rouges de mouton et empêchant l'agglutination ultérieure de ceux-ci par une agglutinine anti-mouton.

En 1947, Milzer et Nathan [2] ont effectué comparativement la réaction de Paul et Bunnell suivant la technique classique et une réaction modifiée en se servant, comme liquide de dilution, du sérum humain débarrassé des agglutinines anti-mouton et décomplémenté. Ils ont constaté que le titre obtenu était ainsi plus élevé que celui fourni par la méthode standard. Dans un cas, la réaction de Paul et Bunnell était négative et le titre obtenu en solution sérique était de 1/80. Dans un autre cas, le titre en solution sérique présentait une valeur anormale cinq jours avant l'apparition de la réaction Paul et Bunnell positive.

Les mêmes auteurs, en 1949 [3], ont constaté que le titre des anticorps hétérophiles était plus élevé lorsqu'on utilisait comme liquide de dilution du sérum humain ou du liquide d'ascite. Par contre, le titre n'est pas plus élevé lorsqu'on utilise l'albumine de bœuf ou l'albumine humaine concentrée. Cependant, les auteurs n'ont pas obtenu, à l'aide de cette modification technique, de réaction positive dans les cas où la réaction de Paul et Bunnell classique était négative.

En 1949, Moloney et Malzone [4] ont examiné, à l'aide d'une technique analogue, le sérum de 44 sujets présentant une réaction de Paul et Bunnell positive et le sérum de deux sujets ayant un titre élevé d'anticorps anti-Forssman et n'ont pu mettre en évidence d'anticorps de type bloquant ou hyperrimmun. De même, l'examen de 6 malades avec sérologie négative mais tableau clinique et hématologique caractéristique n'a pas mis en évidence d'anticorps de type incomplet.

Cependant, le fait que c'est la réaction de Coombs, Mourant et Race, utilisant le sérum anti-globuline qui possède la plus grande sensibilité de détection des agglutinines de type incomplet, et le fait que, à elle seule, elle est capable de déceler certains anticorps du type incomplet, nous a amenés à rechercher parallèlement, au cours de la mononucléose infectieuse, les anticorps de type incomplet à l'aide de cette méthode et d'autres techniques.

C'est ainsi que nous avons étudié systématiquement tous les sérums qui nous ont été adressés au laboratoire pour diagnostic.

ou qui nous ont été confiés (1). Nous avons examiné, au total, 57 sérums présentant une réaction de Paul et Bunnell positive et 89 sérums de sujets suspects de mononucléose infectieuse avec réaction de Paul et Bunnell négative.

Après exécution de la réaction de Paul et Bunnell, selon la technique précisée par Demanche en France, les sérums examinés étaient mis en tubes stériles et conservés à moins 20° pour la plupart d'entre eux, dans les mêmes conditions que les sérums contenant des agglutinines irrégulières.

Nous avons, dans un premier temps, constaté que le remplacement de l'eau physiologique par de l'albumine de bœuf concentrée à 20 p. 100 ne permettait pas d'obtenir un titre supérieur de plus d'un tube au titre standard obtenu.

Le sérum de mouton chauffé ou frais ne nous a pas donné de titre supérieur à celui obtenu à l'aide d'eau physiologique et nous avons même constaté assez souvent une inhibition de l'agglutinine anti-mouton. Seul le sérum humain d'homme adulte, chauffé et débarrassé des agglutinines anti-mouton, nous a permis d'obtenir un titre légèrement supérieur de 1 à 3 tubes en général.

Dans deux cas où il existait un titre élevé d'agglutinine anti-mouton, nous avons obtenu une augmentation du titre à l'aide de ces techniques, mais chez l'un de ces malades, nous avons affaire à un anticorps de type Forssman apparu après une injection de sérum thérapeutique. Dans aucun des cas de réaction de Paul et Bunnell négative, l'emploi de ce liquide de dilution ne nous a permis de mettre en évidence des anticorps non décelés par la technique classique.

Au cours d'une étude comparative du taux des agglutinines de la mononucléose infectieuse vis-à-vis des globules rouges d'une trentaine de moutons et d'une vingtaine de chèvres, nous avons constaté qu'il existe certaines *différences* dans l'agglutinabilité des globules rouges des divers animaux appartenant à ces espèces. Un même sérum peut présenter un titre agglutinant de 1/56 vis-à-vis des globules rouges d'un animal et un titre de 1/448 vis-à-vis des globules rouges d'un autre animal, sans que ceci soit imputable aux erreurs de lecture ou de dilution. Cette agglutinabilité est, semble-t-il en rapport avec la constitution antigénique de l'animal et ses groupes sanguins, comme nous l'étudions actuellement avec P. Millot. Le fait que ce caractère se retrouve aussi bien chez certains moutons que chez certaines chèvres, ne nous incite pas à proposer le remplacement des globules rouges de mouton par des globules rouges de chèvre dans l'exécution de la réaction de Paul et Bunnell. Mais elle doit

(1) Nous tenons à remercier M. Mollaret.

nous permettre de comprendre la différence de titres obtenue dans l'examen du même sérum dans des laboratoires différents.

L'obtention d'un sérum de chèvre anti-globuline humaine de titre élevé nous a permis d'exécuter systématiquement la réaction de Coombs indirecte sur les sérums de sujets atteints ou suspects de mononucléose infectieuse.

Au point de vue technique, après lecture du titre de l'agglutinine anti-mouton en eau physiologique, on effectue trois lavages à l'eau physiologique sur les globules qui n'ont pas été agglutinés par le sérum et on ajoute dans chaque tube 11 gouttes de sérum anti-globuline dilué de manière convenable. Ce sérum anti-globuline a été préparé de telle manière qu'il ne contienne pas d'agglutinine vis-à-vis des globules rouges de mouton utilisés, et dilué suivant les résultats obtenus par l'étude des anticorps anti-Rh incomplets.

Dans tous les cas de réaction de Paul et Bunnell positive, nous avons obtenu un titre d'anticorps, décelable par la réaction de Coombs, indirect supérieur de un ou deux tubes au titre de l'agglutinine anti-mouton dans de l'eau salée. Il en a été de même au cours de l'examen de sérums à réaction de Paul et Bunnell négative examinés immédiatement après leur réception.

Cependant, nous avons constaté que certains sérums qui avaient été conservés en glacière et non au congélateur à -20° présentaient une réaction de Coombs indirecte très positive donnant un titre de 1/10 000 ou 1/20 000, alors que le titre de l'agglutinine anti-mouton était de 1/10 ou 1/20.

Connaissant la thermostabilité des anticorps de type incomplet anti-Rh, anti-A et anti-Forssman, nous avons étudié le caractère de ce phénomène et avons constaté que les sérums chauffés pendant dix minutes à 56° perdaient leurs propriétés d'anticorps anti-globules rouges de mouton de type incomplet. Le phénomène était paradoxal puisque les anticorps incomplets connus résistent à une température de 65° et même 70° .

Le phénomène ainsi mis en évidence pouvait être rapproché de celui décrit par Thomsen et Friedenreich. En effet, ces mêmes sérums présentaient une agglutination des globules rouges de mouton lorsqu'on remplaçait l'eau physiologique par du sérum de mouton ou du sérum humain ne présentant pas d'agglutinines anti-mouton. De plus, ces mêmes sérums présentaient un phénomène analogue lorsqu'on examinait leurs propriétés vis-à-vis des globules rouges humains de groupe O. Cependant, les agglutinines irrégulières ne pouvaient être supposées exister dans ces sérums qui provenaient de sujets non transfusés et non immunisés vis-à-vis des antigènes de groupe sanguin humain.

Il était donc logique d'attribuer le phénomène constaté à la présence d'un enzyme panagglutinant provenant d'une contami-

nation bactérienne. La preuve peut en être donnée par la transmission de cette propriété à d'autres sérums. C'est ainsi que 1/10 de ml de sérum donnant le phénomène décrit, dilué dans 0,9 ml de sérum de sujet normal, frais et stérile, permet d'obtenir le même résultat après plusieurs heures de contact. Dans certains de ces cas, nous avons pu, avec M. Saint-Paul, isoler des bactéries qui, de même que le vibron cholérique, possèdent la propriété de transformer les globules rouges avec lesquels elles sont mises en contact de telle manière qu'ils deviennent agglutinables par certains composants sériques existant dans le sérum de l'adulte. Les différents phénomènes qu'on peut ranger dans le même cadre peuvent dépendre de l'action d'un enzyme sur les globules rouges mais aussi de la sécrétion d'enzymes directement agglutinants. Certaines bactéries sont susceptibles de donner naissance à la fois à des enzymes agglutinants et à des enzymes modifiant les propriétés antigéniques de globule rouge. Comme nous l'avons vu avec M. Saint-Paul, les transformations observées ne sont pas uniformes et tous les enzymes mis en évidence ne semblent pas se fixer sur le même récepteur. Les globules rouges ainsi transformés n'acquièrent pas tous les mêmes caractères antigéniques.

Ces points particuliers sont d'une grande importance puisque les globules rouges ainsi transformés permettent de mettre en évidence les anticorps incomplets appartenant à certains systèmes de groupes sanguins.

Mais la recherche des anticorps incomplets doit être subordonnée à l'exécution d'épreuves de contrôle essentielles.

C'est ainsi que la simple constatation d'une agglutination en milieu non salin ne doit pas être considérée automatiquement comme un anticorps de type incomplet et qu'en particulier les phénomènes décrits sous le nom de forme incomplète d'agglutinine froide (Dacie [5, 6]) peuvent être absolument réalisés par une contamination microbienne passée inaperçue. En effet, Dacie a désigné sous le nom d'agglutinine froide de forme incomplète une agglutination des globules rouges humains à basse température en milieu sérique au lieu du milieu salin. Ce même phénomène était transmissible d'un sérum examiné à un sérum frais négatif. Cette propriété était détruite après dix minutes à 56°.

Bien que l'existence de formes incomplètes d'agglutinine froide ne puisse être encore affirmée ou niée, il est essentiel, au cours de leur étude, de tenir compte des erreurs attribuables aux phénomènes enzymatiques dont nous avons souligné l'importance. C'est un point sur lequel on ne saurait trop insister, étant donné la multiplicité actuelle des réactions utilisant des globules rouges comme supports ou fixateurs d'antigènes spécifiques.

ETUDE DES SÉRUMS
DÉBARRASSÉS DE LEUR AGGLUTININE COMPLÈTE.

Puisque à l'aide du système globules rouges de mouton — sérum de chèvre anti-globuline humaine — il était impossible de révéler l'existence d'anticorps incomplets dans les sérums à réaction de Paul et Bunnell négative et que dans les sérums à réaction de Paul et Bunnell positive, on pouvait supposer que les anticorps existent et sont d'un titre inférieur au titre d'agglutinine complète anti-mouton, nous avons étudié les propriétés présentées par les sérums après absorption ou destruction d'agglutinines complètes :

1° ETUDE DE L'EFFET DE CHAUFFAGE. — Nous avons étudié particulièrement trois sérums à réaction de Paul et Bunnell positive et nous avons constaté que le titre d'agglutinine anti-mouton n'est pas modifié par le chauffage à 65° pendant trente minutes.

Le titre n'est diminué de manière significative qu'après quinze minutes à 70°.

La réaction de type indirect effectuée avec le sérum de chèvre anti-globuline humaine nous a donné un résultat négatif sur tous les tubes non agglutinés entièrement par les sérums chauffés à 70°.

Par analogie avec la recherche d'agglutinines anti-A de type hyperimmun, grâce à la technique de Witebsky [7] utilisant l'absorption des agglutinines actives sous forme complète par les substances de groupes sanguins A et B, nous avons tenté de dissocier les agglutinines incomplètes des agglutinines anti-mouton en absorbant celles-ci à l'aide de différents antigènes.

a) L'utilisation des phosphatides extraites du cœur de bœuf seules ou associées à du cholestérol n'a pas permis l'absorption des agglutinines anti-mouton.

b) L'absorption à l'aide de globules rouges de bœuf bouillis est possible, mais l'exécution de la technique utilisant le sérum anti-globuline ne révèle pas l'existence d'anticorps de type incomplet.

c) L'absorption est possible à l'aide de stroma de globules rouges de bœuf préparés par hémolyse de globules rouges de bœuf à basse température et recueillis après centrifugation à 30 000 tours et lavage trois fois à l'eau physiologique. Tous les sérums examinés ont eu leur agglutinine anti-mouton absorbée, mais après absorption nous n'avons pas constaté l'existence d'anticorps incomplet.

d) L'antigène, obtenu par la méthode de Schwarzwiss et Tomesik d'extraction par l'alcool à 80 p. 100 de stroma de globules rouges de bœuf, permet l'absorption des agglutinines

complètes, mais aucun anticorps incomplet n'est ensuite révélé à l'aide du sérum anti-globuline.

e) On peut obtenir le même résultat à l'aide de l'antigène extrait du foie de bœuf, par la technique de Schwarzwelss et Tomcsik. Aucun anticorps incomplet n'est révélaible vis-à-vis de globules rouges de mouton, soit en utilisant comme liquide de dilution l'albumine de bœuf concentrée à 20 p. 100, soit le sérum humain, soit à l'aide du sérum anti-globuline.

Cependant, on ne peut incriminer la qualité du sérum anti-globuline, car ce même sérum permet de révéler l'existence d'anticorps incomplets chez les sujets présentant une iso-agglutinine anti-A de type hyperimmun après absorption des agglutinines complètes à l'aide des substances de groupes sanguins. On pouvait ainsi supposer que la réaction utilisant le sérum anti-globuline n'était pas favorable à la mise en évidence d'anticorps incomplets, éventuellement fixés sur les globules rouges de mouton.

2° ETUDE DE L'ACTION DE LA TRYPSINE. — On sait qu'il est possible de déceler les anticorps déterminant certains groupes sanguins humains en utilisant des globules rouges transformés sous l'action de la trypsine ; ainsi les globules rouges Rh positif peuvent être agglutinés, même s'ils sont mis en suspension dans l'eau physiologique par des agglutinines anti-Rh incomplètes [8, 9].

Nous avons préparé des globules rouges de mouton recueillis sur citrate de soude, lavés trois fois à l'eau physiologique et modifiés sous l'action de la trypsine pendant trente minutes à 37°.

Nous avons constaté que le titre d'agglutinine anti-mouton vis-à-vis des globules rouges trypsinisés après un contact d'une heure à 37° n'était pas supérieur de plus d'une dilution à celui obtenu dans les mêmes conditions vis-à-vis de globules rouges normaux par la réaction de Paul et Bunnell classique. L'utilisation de sérum de mouton comme liquide de dilution ne permet pas d'obtenir des titres plus élevés.

L'utilisation de l'albumine de bœuf concentrée à 20 p. 100 comme liquide de dilution et de suspension de globules rouges trypsinisés fournit un titre analogue à celui obtenu vis-à-vis de globules rouges normaux mais renforce l'intensité d'agglutination. Ainsi il n'est pas possible de mettre en évidence des anticorps incomplets en utilisant les globules rouges de mouton trypsinisés.

On sait qu'il est possible de révéler l'existence d'anticorps incomplets en mettant en contact avec une solution de trypsine des globules rouges Rh positif ayant fixé une agglutinine anti-Rh. Une technique analogue appliquée aux globules rouges de mouton mis en contact avec les sérums à réaction de Paul et Bunnell positive ou de sujets suspects de mononucléose infectieuse n'a pas montré d'anticorps incomplets actifs sur les globules rouges de mouton.

Nous avons appliqué la même technique de détection à la recherche des anticorps actifs sur les globules rouges de bœuf. Nous avons constaté que le titre de l'agglutinine anti-globules rouges de bœuf était compris entre 1/5 et 1/80 et n'était pas en rapport avec le titre de l'agglutinine anti-mouton. L'adjonction de trypsine diluée aux globules rouges de bœuf mis en contact avec les sérums de sujets atteints de mononucléose infectieuse, de sujets suspects et de sujets normaux a permis de constater que les sujets normaux ne présentent pas d'anticorps révélables après l'adjonction de trypsine. Dans le cas de sérum à réaction de Paul et Bunnel positive, l'adjonction de trypsine permet d'obtenir une agglutination supplémentaire dans les 4 ou 5 tubes suivants.

Dans les cas de sérums suspects, nous avons obtenu par l'adjonction de trypsine diluée une agglutination dans 2 ou 3 tubes suivants.

Ainsi l'existence d'anticorps incomplets est prouvée dans les sérums de sujets atteints de mononucléose infectieuse. Il est encore nécessaire d'examiner un plus grand nombre de cas de sujets suspects de mononucléose infectieuse avec réaction de Paul et Bunnel négative pour établir l'importance diagnostique de ces anticorps incomplets.

En résumé, l'examen des sérums de sujets atteints de mononucléose infectieuse à l'aide des techniques de recherche des anticorps incomplets, utilisant le sérum anti-globuline humaine, les globules rouges trypsinisés, ou l'adjonction de trypsine après contact, n'a pas permis de révéler l'existence d'anticorps incomplets se fixant sur les globules rouges de mouton.

Mais l'emploi de la technique utilisant la trypsine diluée décele l'existence, dans les sérums à réaction de Paul et Bunnel positive, d'anticorps incomplets après fixation sur les globules rouges de bœuf. Il reste à étudier la valeur de cette constatation sur un grand nombre de sérums.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. LEVINE et GILMOUR. *Science*, 1945, **101**, 411.
- [2] A. MILZER et S. NATHAN. *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1947, **66**, 619.
- [3] A. MILZER et S. NATHAN. *J. lab. clin. Med.*, 1949, **34**, 1014.
- [4] W. C. MOLONEY et L. MALZONE. *Blood*, 1949, **4**, 722-727.
- [5] J. V. DACIE. *III^e Congrès International d'Hématologie*, Cambridge, 1950.
- [6] J. V. DACIE. *Nature*, 1950, **166**, 4209-4236.
- [7] E. WITEBSKY. *Blood. J. Hematol.*, 1948, **3**, 2.
- [8] M. M. PICKLES. *Nature*, 1946, **158**, 880.
- [9] J. A. MORTON et M. M. PICKLES. *Nature*, 1947, **159**, 779.

LES VACCINATIONS ANTIRABIKES A L'INSTITUT PASTEUR EN 1950

par R. BÉQUIGNON et Ch. VIALAT.

Ce rapport, établi suivant le plan fixé par la Conférence internationale de la Rage, concerne l'année 1950.

1° Personnes traitées.

395 personnes se sont présentées à la consultation du service des vaccinations antirabiques. A 105 le traitement a été conseillé.

2° Méthode de traitement.

La méthode employée est la méthode Pasteurienne.

Les moelles sont soumises à la dessiccation, en chambre noire à 22°, dans des flacons munis de deux tubulures fermées par de l'ouate ordinaire et dont le fond est garni de potasse caustique. Après deux, trois ou quatre jours de dessiccation, les moelles sont introduites dans des pots-bans contenant 20 cm³ de glycérine neutre à 30° Baumé et stérilisés à l'autoclave à 120°.

Ce procédé de conservation des moelles en glycérine, proposé par E. Roux en 1887 [1] et introduit dans la pratique par A. Calmette en 1891, est adopté, depuis 1911, à l'Institut Pasteur.

Les moelles ainsi traitées sont conservées à la glacière à +3°.

Elles ne sont plus utilisées pour la vaccination lorsqu'elles ont séjourné dix à douze jours en glycérine.

Chaque jour, les sujets en traitement reçoivent 4 à 5 mm. de moelle desséchée et triturée dans 3 cm³ d'eau distillée stérile. Le traitement a une durée de quinze, dix-huit, vingt et un ou vingt-cinq jours, suivant la gravité des morsures.

*
* *

Le virus fixe actuellement utilisé représentait, le 31 décembre 1950, le 1853^e passage de la souche isolée par Pasteur le 19 novembre 1882 et employée pour la vaccination, à partir du 90^e passage, lors de la création du service de vaccination antirabique rue d'Ulm.

Afin d'éviter l'infection possible des moelles, celles-ci sont extraites avant la mort des animaux, qui sont saignés dès que la paralysie est complète.

Le procédé d'extraction des moelles est celui décrit par Oshida.

*
* *

Formule du traitement d'après l'âge des moelles.

1 ^{er} jour	Moelle de 4 jours (3 cent. cubes).
2° —	— 4 — —
3° —	— 4 — —
4° —	— 4 — —
5° —	— 3 — —
6° —	— 3 — —
7° —	— 3 — —
8° —	— 3 — —
9° —	— 2 — —
10° —	— 3 — —
11° —	— 3 — —
12° —	— 2 — —
13° —	— 3 — —
14° —	— 3 — —
15° —	— 2 — —
16° jour	Moelle de 3 jours (3 cent. cubes).
17° —	— 3 — —
18° —	— 2 — —
19° jour	Moelle de 2 jours (3 cent. cubes).
20° —	— 2 — —
21° —	— 2 — —
22° —	— 2 — —
23° —	— 2 — —
24° —	— 2 — —
25° —	— 2 — —

3° Répartition des personnes traitées d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues :

Afrique	3
France.	102

4° Répartition des personnes traitées suivant l'animal mordeur.

Chiens de propriétaires connus	52
Chiens errants	45
Chats de propriétaires connus	2
Chats errants	4
Singe	1
Renard	1

5° Répartition des personnes traitées d'après les preuves de rage chez l'animal mordeur.

Catégorie A. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par le développement de la maladie chez des animaux inoculés avec le cerveau ou par un examen histologique.

Catégorie B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Catégorie C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Catégorie A	0
Catégorie B.	6
Catégorie C.	99

Les névraxes de 109 animaux ont été examinés par le service des vaccinations antirabiques. Soixante et onze fois les commémoratifs de la morsure de l'animal et l'examen histologique du système nerveux nous ont autorisés à arrêter le traitement chez les personnes mordues.

Les principes généraux qui ont dicté cette décision ont été rappelés dans un rapport précédent [2].

6° Répartition des personnes traitées d'après les caractères de la morsure :

Profondes	80
Superficielles	25

7° Répartition des personnes traitées suivant que les vêtements ont été interposés ou non :

Peau nue	90
Vêtements interposés	15

8° Répartition des personnes traitées d'après le siège de la morsure (*) :

Tête.	5
Membres supérieurs.	70
Tronc.	0
Membres inférieurs	30

9° Répartition des personnes traitées d'après le nombre de jours écoulés entre la morsure et le traitement :

0 à 4 jours.	55
5 à 7 jours.	34
8 à 14 jours.	11
15 à 21 jours	5
Plus de 21 jours.	0

(*) Quand il s'agit de morsures multiples, seul est indiqué le siège de la morsure la plus dangereuse.

10° *Autres renseignements :*

Répartition des personnes traitées par départements :

Aube.	1	Manche.	1
Calvados.	1	Nord.	5
Charente.	1	Orne.	1
Cher.	2	Rhin (Bas-).	1
Corse.	3	Sarthe.	1
Creuse.	3	Seine { Paris.	21
Dordogne.	1	Banlieue.	30
Eure-et-Loir.	1	Seine-Inférieure.	2
Ille-et-Vilaine.	3	Seine-et-Marne.	3
Indre.	1	Seine-et-Oise.	12
Indre-et-Loire.	3	Sèvres (Deux-).	1
Landes.	1	Somme.	1
Loiret.	2		

★
★★

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine.

ANNÉES	PERSONNES traitées	CATÉGORIE A	CATÉGORIE B	CATÉGORIE C	DÉCÈS	MORTALITÉ p. 100
1886	2 671	231	1.926	514	25	0,94
1887	1.770	357	1.456	257	14	0,79
1888	1.622	402	972	255	9	0,55
1889	1.830	346	1.187	297	7	0,38
1890	1.540	416	900	215	5	0,32
1891	1.559	324	915	320	4	0,25
1892	1.790	128	1.062	600	4	0,22
1893	1.648	132	1.008	508	6	0,36
1894	1.384	166	798	423	7	0,50
1895	1.520	122	949	449	5	0,38
1896	1.308	106	747	455	4	0,30
1897	1.529	150	918	461	6	0,39
1898	1.465	141	855	469	3	0,20
1899	1.614	152	1.099	363	4	0,25
1900	1.420	179	866	375	4	0,28
1901	1.321	174	785	362	5	0,38
1902	1.105	150	625	330	2	0,18
1903	628	116	224	288	2	0,32
1904	755	148	330	277	3	0,39
1905	727	166	306	255	3	0,41
1906	772	173	396	203	1	0,13
1907	786	135	384	267	3	0,38
1908	524	113	269	142	1	0,19
1909	467	84	210	173	1	0,21
1910	401	98	143	160	0	0,00
1911	342	76	114	152	1	0,29
1912	395	71	145	179	0	0,00
1913	330	73	113	144	0	0,00
1914	373	68	102	203	0	0,00
1915	654	87	301	266	1	0,15
1916	1.388	188	658	542	3	0,21
1917	1.543	216	848	479	4	0,26
1918	1.803	206	885	712	3	0,16

ANNÉES	PERSONNES traitées	CATÉGORIE A	CATÉGORIE B	CATÉGORIE C	DÉCÈS	MORTALITÉ p. 100
1919	1.843	231	920	662	3	0,16
1920	1.126	86	554	486	6	0,53
1921	998	64	412	522	1	0,10
1922	754	101	353	300	0	0,00
1923	727	90	363	274	0	0,14
1924	764	135	208	421	1	0,00
1925	782	110	316	356	0	0,00
1926	634	74	246	314	0	0,00
1927	639	78	281	280	0	0,00
1928	671	76	203	387	0	0,00
1929	542	49	231	262	0	0,00
1930	589	77	116	396	0	0,00
1931	531	49	212	270	0	0,00
1932	561	64	271	226	0	0,00
1933	443	41	122	280	0	0,00
1934	496	23	51	422	0	0,00
1935	510	18	42	450	0	0,00
1936	463	13	20	430	0	0,00
1937	454	2	18	434	0	0,00
1938	411	3	11	397	0	0,00
1939	411	2	14	395	0	0,00
1940	449	0	8	441	0	0,00
1941	214	1	0	213	0	0,00
1942	149	0	1	148	0	0,00
1943	131	0	0	131	0	0,00
1944	122	0	1	121	0	0,00
1945	179	0	2	177	0	0,00
1946	228	1	1	226	0	0,00
1947	212	1	3	208	0	0,00
1948	150	1	1	148	0	0,00
1949	129	1	0	128	0	0,00
1950	105	0	6	99	0	0,00
Total général.	55.374	7.085	27.197	21.092	151	0,27

*
* *
* *

Le service antirabique a, en outre, fabriqué en 1950 :

25 litres de vaccin antirabique phéniqué à usage humain et
33 litres de vaccin à usage vétérinaire.

11° *Mesures prises en vue de suivre l'évolution des cas traités pendant six mois au maximum.*

Les médecins sont priés de nous tenir au courant des accidents qui pourraient se produire pendant les six mois qui suivent le traitement.

12° *Accidents paralytiques* : Néant.

13° *Décès* : Néant.

BIBLIOGRAPHIE

[1] Roux (E.). *Ces Annales*, 1887, **1**, 87.

[2] BÉQUIGNON (R.) et VIALAT (Ch.). *Ces Annales*, 1943, **69**, 372.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(*Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.*)

Séance du 10 Mai 1951.

Présidence de M. GASTINEL.

COMMUNICATIONS

COURBE DE CROISSANCE DU VIRUS VACCINAL DANS LA MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDIENNE DE L'ŒUF

par P. LÉPINE, G. WIELGOSZ et L. REINIÉ.

(*Service des Virus, Institut Pasteur.*)

L'objet de la présente étude est de déterminer la courbe de croissance du virus vaccinal dans la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet.

Plus précisément, il s'agit de la détermination quantitative du pouvoir infectieux pour la peau de lapin du virus vaccinal cultivé sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'œuf en incubation, en fonction du temps écoulé depuis l'inoculation de l'œuf.

Il va sans dire que nous admettons au départ que le pouvoir infectieux est proportionnel à la quantité du virus présente dans la membrane, cette relation étant nettement démontrée par les expériences classiques de Parker (Parker et Rivers [1], Parker [2], Parker et coll. [3]) confirmées par celles de Bryan et Beard [4] et de C. Levaditi [5, 6].

Méthode. — Des œufs de poules Leghorn, mis en incubation pendant dix jours à 38-39° C, sont inoculés le onzième jour en déposant sur la membrane chorio-allantoïdienne 0,5 cm³ du matériel virulent.

Ce matériel a été préparé de la manière suivante :

Trois membranes chorio-allantoïdiennes, pesant au total 2,00 g, infectées de neurovaccine (souche Levaditi et Nicolau originale) ont été broyées dans un mortier, mises en suspension au 1 : 10 dans l'eau physiologique et centrifugées à 2 600 t/min. (700 g) pendant cinq minutes.

Le liquide surnageant est distribué en ampoules et conservé à -70°C . Ce matériel a été gardé pendant vingt-quatre à soixante-dix heures à la glacière pour l'expérience n° 1 (voir plus loin) et quinze jours pour l'expérience n° 2. Immédiatement avant l'inoculation, on dilue le matériel à 10^{-5} par rapport au poids original des membranes.

Les œufs sont sacrifiés par séries à différents intervalles à partir du moment de l'inoculation. On prélève la partieensemencée des membranes chorio-allantoïdiennes et après un traitement identique à celui du matériel d'inoculation (broyage, suspension, centrifugation) on opère une série de dilutions, rapportées à l'unité de poids, qui servent pour le titrage.

Celui-ci s'effectue sur la peau de lapin, par injection intradermique de $0,2\text{ cm}^3$ de chaque dilution. Chaque dilution de chaque série est éprouvée sur six lapins : nos résultats sont des moyennes. Les calculs des D. I.₅₀ (doses infectant 50 p. 100 des animaux) se font par la méthode cumulative de Reed et Muench [7].

Les lectures de lésions caractéristiques se font respectivement après quarante heures, soixante-seize heures et cent heures : elles fournissent ainsi les éléments du tracé de trois courbes, semblables mais décalées, qui peuvent être traitées comme résultant de trois variantes d'une même méthode de titrage (courbe I).

Résultats. — Les résultats sont résumés dans les tableaux I et II et représentés par les courbes 1 et 2. Pour les commodités de la représentation et de la discussion des résultats, nous avons adopté la terminologie et les définitions suivantes :

1° Soit C la concentration de virus. On a :

$$C = \frac{1}{D},$$

D étant la dilution qui provoque l'apparition de lésions caractéristiques sur le lapin pour 50 p. 100 des inoculations.

2° La vitesse de croissance est : $\frac{dc}{dt}$ où t = temps exprimé en heures.

3° La vitesse exponentielle de croissance (selon la définition qui en est donnée par Monod [8]) est :

$$\frac{d(\log c)}{dt}.$$

Le tableau I résume les modalités de l'expérience ; les concentrations y sont exprimées en logarithmes.

Le tableau II donne les concentrations en fonction du temps.

Les courbes 1 et 2 correspondent aux tableaux I et II.

L'allure générale de la courbe logarithmique montre tout d'abord que l'on a affaire à un phénomène étendu sur une très vaste échelle de concentration, puisque les concentrations minimum et maximum sont dans un rapport de 1 à 10 000 000.

La courbe commence par une zone qui reste indéterminée pour des raisons tenant aux conditions de l'expérience, et qui s'échelonne entre zéro et douze heures.

Dans cette zone nous sommes amenés à extrapoler : il y a deux

TABLEAU I.

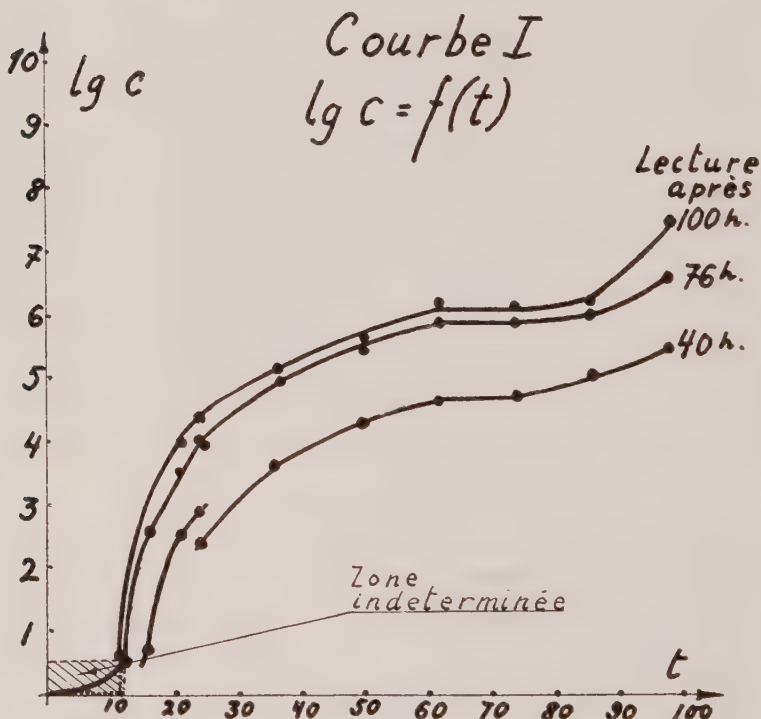
NUMÉRO de l'expérience	NUMÉRO de la série	PRÉLÈVEMENTS SUR ŒUFS				TITRAGES SUR LAPIN		
		Nombre d'œufs prélevés	Poids total des membranes	Durée du développement du virus		Logarithme décimal du titre d'après la lecture après		
				heures	minutes	40 h.	76 h.	100 h.
I	1	9	3,055	0 h.	25	Indéterminé entre 0 et 0,48.		
	2	9	3,610	2 h.	120			
	3	9	3,935	4 h.	240			
	4	9	1,755	8 h. 15	495			
	5	9	7,530	12 h.	720	0,68	2,57	0,48
	6	9	3,215	16 h. 15	975			3,67
	7	9	3,460	21 h. 30	1 290			3,97
	8	5	2,030	24 h.	1 440			4,28
	9	5	2,455	32 h. 30	1 950			4,13
II	1	5	1,312	24 h.	1 440	2,25	4,00	4,25
	2	5	1,451	37 h.	2 220	3,64	5,00	5,00
	3	5	1,590	50 h.	3 000	4,25	5,50	5,53
	4	5	1,760	62 h.	3 720	4,60	5,84	6,24
	5	5	2,405	74 h.	4 440	4,75	5,84	6,00
	6	5	2,395	86 h.	5 160	5,00	6,00	6,00
	7	5	3,525	98 h.	5 640-5 880	5,40	6,50	7,40
	8	5	1,450	94-98 h. (morts).		5,00	6,31	7,40

TABLEAU II.

DURÉE DU DÉVELOPPEMENT DU VIRUS		CONCENTRATION EN VIRUS d'après l'examen de 76 heures
heures	minutes	
0 h. 25	25	Indéterminée entre 1 et 3,02.
2 h.	120	
4 h.	240	
8 h. 15	495	
12 h.	720	372 3 310 10 000 8 910 100 000 316 000 692 000 692 000 1 000 000 3 160 000
16 h. 15	1 140	
21 h. 30	1 290	
24 h.	1 440	
24 h. 30	1 470	
37 h.	2 220	
50 h.	3 000	
62 h.	3720	
74 h.	4 440	
86 h.	5 160	
98 h.	5 880	

manières de le faire. On peut soit, en vertu d'un désir de continuité, tracer un segment représenté en trait continu sur notre courbe, soit marquer une période de latence jusqu'à la onzième heure et faire repartir la courbe de croissance sous un angle d'à peu près 90°. Dans le premier cas, la vitesse exponentielle de croissance (non représentée) passerait par un maximum très aigu situé entre la douzième et la seizième heure. Dans la deuxième éventualité, cette courbe serait discontinue aux environs de douze heures.

Cette deuxième hypothèse nous paraît la plus vraisemblable car elle

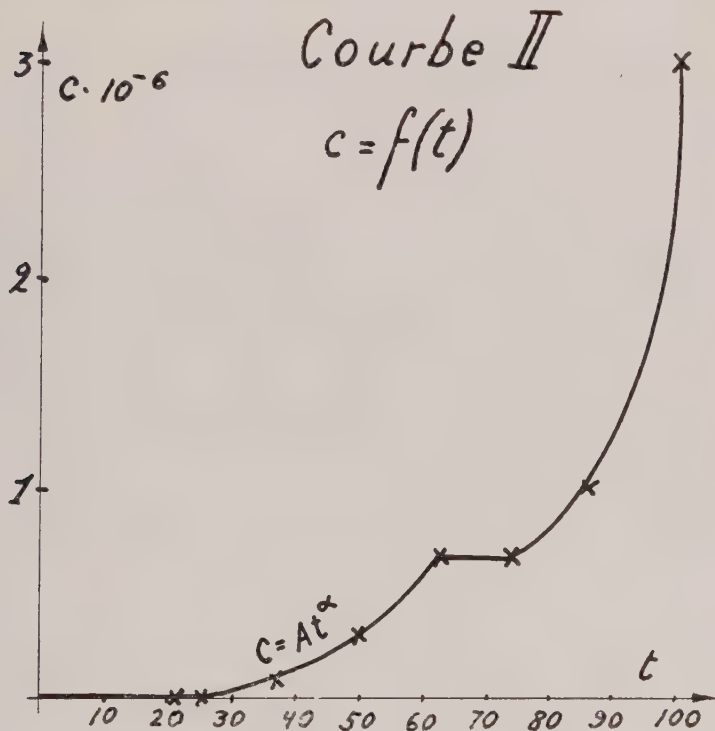


correspondrait, pour la croissance du virus vaccinal dans la membrane chorio-allantoïde, au phénomène déjà observé par Levaditi et Nicolau [9] dans le cas d'inoculation du virus vaccinal dans le cerveau du lapin. Il paraît, du reste, s'agir là d'un phénomène général qui, retrouvé et étudié par Levaditi, P. Lépine et R. Schoen [10] dans le cas de l'encéphalite toxoplasmique du lapin, puis par Nicolau avec le virus rabique et le virus herpétique, a été dénommé par ce dernier auteur « le phénomène de l'éclipse ».

Sans trancher pour l'instant entre ces deux hypothèses, il est possible d'énoncer la seule affirmation expérimentale certaine, à savoir que la vitesse exponentielle de croissance diminue constamment pendant une

très longue période de trois jours (entre la douzième et la quatre-vingt-quatrième heure) tout en présentant peut-être un seul palier. En effet, rien ne permet d'exclure la possibilité que notre courbe offre un segment rectiligne, entre la seizième et la vingt-quatrième heure, et que, par conséquent, la vitesse exponentielle de croissance soit constante pendant cette période.

A partir de la vingt-quatrième heure, la courbe logarithmique ralentit son accroissement jusqu'à la soixante-deuxième heure où elle s'arrête sur une valeur constante pour y rester pendant douze heures.



A partir de la soixante-quatorzième heure et jusqu'à la mort de l'embryon qui survient environ vingt-quatre heures plus tard (aux environs de la quatre-vingt-dix-huitième heure) nous assistons au phénomène curieux de la reprise de croissance du virus, avec une vitesse qui ne cessera de croître jusqu'à la mort de l'œuf.

Considérons maintenant la courbe 2. En dehors des détails déjà relevés sur la courbe logarithmique, tels que la période de latence, l'arrêt de la croissance entre la soixante-deuxième et la soixante-quatorzième heure et la reprise de la croissance pendant les vingt-quatre heures qui précèdent la mort de l'embryon, cette courbe montre le comportement de la vitesse de croissance proprement dite. Le fait

le plus frappant est que cette vitesse n'est jamais négative. La courbe 2 résulte en effet de trois phénomènes qui se suivent dans le temps, mais qui, à aucun moment, ne comportent de diminution de la concentration en virus.

A partir du début de l'expérience et jusqu'à la cinquante-cinquième heure, nous assistons à un développement rapide du virus dont la vitesse ne cesse de croître. Nous proposons comme formule empirique représentant cette partie de la courbe l'expression :

$$C = At^2$$

où C est la concentration, t le temps ;

A et α sont des constantes, α étant de l'ordre 2,5.

Nous tenons toutefois à souligner que nous n'attachons à cette expression, dont le caractère est purement formel, aucune signification liée au mécanisme de la multiplication.

Entre la soixante-deuxième heure et la soixante-quatorzième, la vitesse de croissance tombe à zéro ; le virus conserve sa concentration.

Après la soixante-quatorzième heure, nous assistons à une nouvelle croissance qui finira par, ou avec, la mort de l'embryon. Ce dernier phénomène ne peut pas être expliqué en se basant uniquement sur nos résultats. On peut toutefois proposer une hypothèse selon laquelle le virus, ayant épuisé un substrat A pendant la première croissance, s'attaquerait à un substrat B pendant la deuxième. Le substrat B présenterait une importance décisive pour la vie de l'animal et sa destruction ou sa transformation, peut-être partielle, provoquerait la mort. Les deux substrats peuvent évidemment être aussi bien constitués par différentes espèces de cellules que par différents éléments de la cellule elle-même.

Résumé. — 1° Nous avons déterminé la courbe de croissance du virus vaccinal dans les membranes chorio-allantoïdiennes de l'œuf en incubation ;

2° La vitesse de cette croissance $\frac{dc}{dt}$ n'est jamais négative ;

3° La multiplication du virus est de l'ordre de dix millions de fois ;

4° Il y a lieu de distinguer trois périodes essentielles de la croissance :

a) Une première croissance de zéro à soixante-deux heures : la vitesse de croissance augmente entre zéro et cinquante-cinq heures et diminue entre cinquante-cinq et soixante-deux heures ;

b) Un arrêt total de la croissance entre soixante-deux et soixante-quatorze heures, la concentration en virus restant stationnaire ;

c) Une deuxième croissance de soixante-quatorze heures jusqu'à la mort de l'embryon qui survient aux environs de quatre-vingt-dix-huit heures.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. F. PARKER et Th. M. RIVERS. *J. exp. Med.*, 1936, **64**, 439.
- [2] R. F. PARKER. *J. Exp. Med.*, 1938, **67**, 725.
- [3] R. F. PARKER et coll. *J. Exp. Med.*, 1941, **74**, 263.
- [4] W. R. BRYAN et J. W. BEARD. *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, 1940, **43**, 380.

- [5] C. LEVADITI et coll. *Ces Annales*, 1940, **64**, 359 et 466.
- [6] C. LEVADITI. *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 462.
- [7] L. J. REED et H. MUENCH. *Am. J. Hyg.*, 1938, **27**, 493.
- [8] J. MONOD. *Ann. R. of Mic.*, 1949, **3**, 371.
- [9] C. LEVADITI et S. NICOLAU. *Ces Annales*, 1923, **37**, 1.
- [10] C. LEVADITI, P. LÉPINE et R. SCHOEN. *Bull. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 1130.

ACTION DE L'AURÉOMYCINE SUR LE VIRUS RABIQUE

par P. REMLINGER et J. BAILLY.

(DEUXIÈME NOTE)

(Institut Pasteur du Maroc, Tanger.)

Une première série de recherches [1] effectuées avec une suspension de chlorhydrate d'auréomycine du commerce avait montré que si les expériences entreprises avec le virus rabique de rue se terminaient toutes par des échecs, les mêmes essais effectués avec le virus fixe fournissaient des résultats encourageants comparables à ceux obtenus par MM. C. Levaditi et A. Vaisman [2] avec un autre ultravirus, celui de la fièvre aphteuse. Il était à présumer que des résultats meilleurs eussent été obtenus si, au lieu d'avoir été effectuées avec une suspension d'auréomycine, les expériences l'avaient été avec une solution du même produit. Elles ont pu être faites grâce à l'amabilité des firmes Lederle et Rhône-Poulenc. Leur résultat n'a pas été celui qui était escompté. Entre temps, nous avons eu connaissance de recherches analogues entreprises à Ankara par MM. Zuhdi Berke et Abdulkadir Cilesiz [3]. Dans leurs expériences, l'auréomycine s'est montrée *in vitro* capable d'inactiver, après deux heures de contact, le virus fixe au 1/200. *In vivo*, les essais de traitement *per os* ou par voie intracérébrale de lapins inoculés avec le même virus ont donné des résultats négatifs. Seuls ont été observés quelques retards dans l'apparition des symptômes et le moment du décès. Des résultats moins favorables encore ont été obtenus avec la terramycine. Dans nos expériences personnelles, 50 mg de chlorhydrate d'auréomycine sont dissous dans 5 cm³ de solution physiologique et mis en contact avec une émulsion de virus fixe à 1 p. 20 filtrée sur papier, dans les proportions de 1 cm³ de virus pour des volumes d'auréomycine respectivement égaux à 1 cm³, 1/2 cm³, 1/3 de cm³, 1/5 de cm³, 1/10 de cm³. Un volume d'émulsion virulente additionné d'un volume de solution physiologique est pris comme témoin. Après vingt-quatre heures de contact à 6°, à l'obscurité, on inocule de chaque mélange 0,25 cm³ sous la dure-mère du lapin. Le mélange contenant 1 volume de virus fixe pour 1/10 de vol. d'auréomycine donne la rage en même temps que le mélange témoin. L'auréomycine inactive donc le virus fixe *in vitro* et la proportion de 1/5 d'auréomycine constitue la dose minima. Le calcul montre que le mélange sous la dose de 0,25 cm³ inoculée sous la dure-mère du lapin

renferme en poids 2,5 mg de virus pour 1,4 de mg d'auréomycine. L'auréomycine amorphe pour usage *per os*, l'auréomycine « cristalline » pour usage intraveineux, l'auréomycine cristalline « for laboratory use only » des Laboratoires Lederle et l'auréomycine Spécia (Richter-Poulenc) se comportent de façon identique. 2,50 mg de virus fixe sont donc inactivés *in vitro* par 1,4 de mg d'auréomycine.

L'inactivation est-elle instantanée ou demande-t-elle un certain temps de contact comme si une action diastasique devait avoir besoin de se développer ? On prépare une émulsion de virus fixe à 1 p. 20 et une solution d'auréomycine à 50 mg pour 5 cm³ de solution physiologique. On mélange volume pour volume et on inocule des doses fixes de 0,25 cm³ sous la dure-mère du lapin après des temps de contact variables : immédiatement après la préparation et après une, quatre, cinq, six et vingt et une heures. Un mélange après vingt-quatre heures de contact d'un volume égal d'émulsion rabique et de solution physiologique est pris comme témoin. Seuls survivent les lapins inoculés avec le virus ayant subi l'action de l'auréomycine pendant six et vingt et une heures. Tous les autres succombent à la rage. L'inactivation du virus rabique exige donc un délai minimum de six heures.

Il résulte de ces recherches qu'au point de vue pratique il n'y a rien à attendre de l'auréomycine pour les traitements préventif et « *cure-tiori* », curatif à la rage. Cet échec ne doit pas, du reste, empêcher de faire porter des recherches sur d'autres antibiotiques et on ne peut que souscrire au souhait de M. le Dr Crivellari, directeur du Laboratoire Pasteur de Buenos-Aires, demandant « la création de subventions et de bourses d'études en vue d'obtenir au cours des dix années à venir un antibiotique permettant de guérir la rage [4].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. REMLINGER et J. BAILLY. *Bull. Acad. Nat. Méd.*, 1950, **434**, 442.
- [2] C. LEVADITI et A. VAISMAN. *Bull. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 1221.
- [3] ZUHDI BERKE et ABULKADIR CILESIZ. *Rev. turque Hyg. Biol. exp.*, 1950, **40**, 373.
- [4] Réponse à un Questionnaire de l'O. M. S.

RECHERCHES BACTÉRIOLOGIQUES SUR UNE INFECTION PURULENTE D'ALLURE ACTINOMYCOSIQUE CHEZ LE CHAT

par A. R. PRÉVOT, P. GORET, L. JOUBERT, P. TARDIEUX
et N. ALADAME (*).

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies et Laboratoire
de Microbiologie de l'Ecole Vétérinaire de Lyon.)

Les travaux de E. Baudet [1] et de A. Brion [2], qui ont montré la fréquence d'*Actinobacterium baudeti* (1) comme agent de l'actinomycose du chat et du chien, semblaient avoir définitivement résolu la question de l'étiologie de cette infection. Recherchant depuis deux ans cet anaérobie dans des syndromes d'allure actinomycosique, chez les carnivores domestiques, nous n'avons réussi à l'isoler qu'une seule fois, chez un chien atteint de pleurésie purulente à grains jaunes. Cette souche a été adressée au Service des Anaérobies de l'Institut Pasteur où elle a fait l'objet d'une étude biochimique et immunochimique comparative avec *Actinobacterium cellulitis* [3].

De cette étude, il ressort que *A. cellulitis* serait une variété de *A. baudeti* et que l'actinomycose humaine à *A. cellulitis* pourrait être transmise à l'homme par l'intermédiaire du chien.

En revanche, nous avons eu la surprise de rencontrer dans 9 cas de suppuration à grains blancs chez le chat, non pas *Actinobacterium baudeti* que nous cherchions, mais des germes anaérobies fusiformes dont sept fois *Fusocillus girans*, Prévot 1940, et deux fois *Fusiformis fusiformis* (Vincent) Topley et Wilson. Cette trouvaille absolument inattendue et non encore signalée permet d'isoler une nouvelle entité nosologique du chat : la suppuration à grains blancs due à *Fusocillus girans* (les infections à *Fusiformis fusiformis* étant déjà connues dans le règne animal).

Nous résumons ici très brièvement chacune de ces observations :

I. Cas 486. — Chatte de 4 ans (service du professeur Collet, octobre 1949).

Abcès du flanc gauche. Ouverture, débridement ; prélèvement du pus, jaune, à nombreux grains riziformes. Diagnostic clinique d'actinomycose cutanée. Isolement d'un anaérobie Gram-négatif. Lavages locaux et thiazomide *per os*. Guérison.

Caractéristiques de la souche 486. — *Fusocillus girans*, variété à colonie bourgeonnante, peu gazogène, type fermentaire propiono-butyro-lactique, non pathogène pour le cobaye et la souris.

(*) Avec la collaboration technique de M. PEYRET et F. GUYARD.

(1) Terminologie selon la classification de PRÉVOT.

II. Cas 490. — Chat de 14 mois (service du professeur Collet, novembre 1949).

Phlegmon de l'avant-bras gauche. Fièvre, pus sanieux, rougeâtre.

Prélèvement : isolement d'un anaérobie Gram-négatif et d'un streptocoque. Thiazomide *per os*. Guérison.

Caractéristiques de la souche 490. — *Fusocillus girans*, variété sérophile à l'isolement, devenue ensuite sérophile non obligée ; peu gazogène ; type fermentaire formo-butyro-lactique. Non pathogène pour le cobaye et la souris.

III. Cas 593 A. — Chat de 2 ans et demi (service du professeur Collet, novembre 1950).

Phlegmon de l'avant-bras gauche, après morsure par un autre chat.

Fièvre, 39°2. Thiazomide ; iodure de potassium. Abscesses métastatiques puis guérison. Du pus, on isole un staphylocoque, un streptocoque et un anaérobie Gram-négatif.

Caractéristiques de la souche 593 A. — *Fusocillus girans*, variété peu gazogène, mais nauséabonde ; type fermentaire acéto-butyro-lactique ; non pathogène pour le cobaye et la souris.

IV. Cas 593 B. — Chat de 4 ans (service du professeur Lucam, novembre 1950).

Péritonite aiguë, mortelle en huit jours. A l'ouverture, liquide purulent à grains blancs. Les grains prélevés et lavés sont ensuite ensemencés en gélose profonde V. F. au sérum et donnent naissance à des colonies anaérobies d'un bacille Gram-négatif.

Caractéristiques de la souche 593 B. — *Fusocillus girans*, variété sérophile à l'isolement, devenue ensuite normale ; peu gazogène, type fermentaire acéto-butyro-lactique ; non pathogène pour le cobaye et la souris.

V. Cas 627. — Chat siamois de 2 ans (service du professeur Brion, février 1951).

Phlegmon du coude droit. A la ponction, pus sanieux qui, ensemencé, donne un staphylocoque et un anaérobie Gram-négatif. Fontamide *per os*. Guérison.

Caractéristiques de la souche 627. — *Fusocillus girans*, à type fermentaire propiono-butyro-lactique.

VI. Cas 628. — Chat de 9 ans (service du professeur Brion, février 1951).

Actinomycose du maxillaire. Fièvre, 38°7. Prélèvement au niveau de la fistule : pus rougeâtre mal lié. Ensemencé en gélose profonde : culture pure d'un anaérobie Gram-négatif. Fontamide : guérison.

Caractéristiques de la souche 628. — *Fusocillus girans* à type propiono-butyro-lactique, non pathogène pour le cobaye et la souris.

VII. Cas 638. — Chat de 4 ans (service du professeur Collet, mars 1951).

Phlegmon de l'avant-bras gauche au niveau du carpe. Pus sanieux rouge, ensemencé en gélose profonde + sérum. Donne un streptocoque et un anaérobie Gram-négatif. Fontamide : guérison.

Caractéristiques de la souche 638. — *Fusocillus girans*, variété pen

gazogène, fétide, ne coagulant pas le lait, à type fermentaire isovalériano-propiono-lactique. Non pathogène pour le cobaye et la souris.

Nous rappelons que, avant l'isolement de cette série impressionnante de 7 souches de *Fusocillus girans* à partir de suppurations d'allure actinomycosique du chat, cet anaérobie n'avait été décelé que chez l'homme. La première série de 5 souches décrites par A.-R. Prévot [4] provenait de l'intestin humain (entérocologie). Par la suite, ce même auteur a identifié les souches « tournantes », isolées antérieurement par lui dans l'appendicite aiguë, à *Fusocillus girans*. Il s'agit en effet d'un fusiforme anaérobie dont la mobilité très particulière consiste en un mouvement giratoire : le bâtonnet tourne sur lui-même. Les souches normales humaines appartenaient au type fermentaire acéto-formique.

Les souches isolées chez le chat sont des variétés de l'espèce normale : les unes sont du type butyro-propiono-lactique, les autres du type formo-butyro-lactique ou acéto-butyro-lactique, ou valériano-propiono-lactique.

Deux se présentaient à l'isolement comme sérophiles ; 5 sont peu pathogènes ; enfin, 1 ne coagule pas le lait.

La plupart des infections étudiées se sont installées chez le chat mâle entier à la suite de plaies du membre antérieur ou de la face par morsure. Presque toutes étaient de caractère clinique actinomycosique : pus à grains riziformes, blancs, jaunes, ou rouges hémorragiques. L'une, non traitée, fut rapidement mortelle. Les autres, traitées par les sulfamides, guérèrent toutes.

Devant cet ensemble de faits, il est permis de faire quelques hypothèses :

I. — Le chat serait un réservoir fréquent de *Fusocillus girans*, hôte banal, selon toute vraisemblance, de sa cavité buccale en particulier.

II. — De saprophyte inoffensif, il devient un agent actif de suppuration à grains riziformes après morsure d'un chat par un congénère.

III. — Le chat peut contaminer l'homme et provoquer chez lui des entérocologies et appendicites à *F. girans*.

L'intérêt de ce travail dépasse donc le cadre strictement économique et signale la « fusocilliose » du chat parmi les maladies animales transmissibles à l'homme.

En outre, ce travail préliminaire permettra de résoudre des problèmes connexes : en particulier l'étude du pouvoir pathogène expérimental de cet anaérobie (à l'état isolé ou en association) dont l'animal réceptif est vraisemblablement le chat.

CONCLUSIONS. — 1° Dans 7 cas de suppurations à grains riziformes d'allure actinomycosique chez le chat, aucun *Actinobacterium* ne fut isolé ; en revanche, chaque fois fut isolée une souche de *Fusocillus girans*.

Il existe donc chez le chat une suppuration pseudo-actinomycosique causée par cet anaérobie.

2° Nos conceptions sur l'étiologie du syndrome « actinomycose des Carnivores » paraissent donc modifier, l'unicité des expressions cliniques divergeant avec la multiplicité des espèces responsables de l'infection, vraisemblablement saprophytes de la cavité buccale, pathogènes accessoirement, isolés ou en association.

3° Les souches félines apparaissent comme des variétés de l'espèce

normale pathogène pour l'homme, isolée dans l'appendicite et l'entérocolite. Il paraît raisonnable de ranger cette infection dans le cadre des maladies animales transmissibles à l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. BAUDET. *Ann. Parasitol.*, 1934, **12**, 296.
- [2] A. BRION. *Rev. Med. vétér.*, 1939, **91**, 121 et 1942, **94**, 145.
- [3] A.-R. PRÉVOT, C. MAZUREK et P. TARDIEUX. *S. F. M.*, 10 mai 1951 (à paraître dans ces *Annales*).
- [4] A.-R. PRÉVOT. *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 246 et 249.

UN NOUVEAU MILIEU POUR LA CULTURE DES ANAÉROBIES

par R. SARTORY, J. MALGRAS, J. TOUILLIER et R. VESCHAMBRE.

(Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie de Strasbourg.)

Les bactéries anaérobies trouvent l'énergie nécessaire à leurs réactions vitales dans les oxydo-réductions des fermentations.

L'importance des produits de dégradation des protides dans les milieux de culture est certaine, concurremment à celle des sucres, ceux-ci ayant toujours paru être à la base de ces fermentations, mais les métabolismes de ces deux groupes s'interpénètrent intimement.

Le meilleur milieu que l'on connaisse actuellement est celui de Weinberg et Goy [1], viande de bœuf, foie de bœuf ayant subi la digestion pepsique ; les constituants du milieu étant vraisemblablement albumoses et peptones avec des traces d'acides aminés.

Toutefois, il semble qu'un substrat dans lequel les protides seraient encore plus dégradés, jusqu'au stade acides aminés par exemple, pourrait également être employé avec fruit. A l'appui de cette hypothèse, rappelons que Stickland [2] a montré que *Clostridium sporogenes* trouve l'énergie nécessaire à sa croissance dans une réaction anaérobie entre acides aminés [2]. M^{me} Cohen-Bazire a insisté sur l'importance des amino-acides dans la formation des acides volatils pour certaines souches protéolytiques [3]. Nous pensons qu'il serait très difficile de réaliser un tel milieu dans les laboratoires.

C'est pourquoi nous avons pensé réaliser un substrat simple rappelant les produits déshydratés américains Difco ou BBL et nous nous sommes adressés à différents protéolysats commerciaux.

Les essais ont été faits au moyen du protéolysat Oberval et du protéolysat Ronchèse. Le premier « est le résultat d'une hydrolyse acide et d'une hydrolyse enzymatique sur un mélange caséine, viande de bœuf, sang et levures, auquel on ajoute un hydrolysat pancréatique pour compenser les pertes dues à l'hydrolyse acide. Le produit est débarrassé

des grosses molécules par précipitation à l'aide d'électrolytes, puis purifié par dialyse » [4]. Le protéolysat Ronchèse est préparé sensiblement de la même manière, les deux dernières opérations en moins. Les protéines utilisées sont celles du lait, du muscle et du plasma sanguin.

Nous obtenons le milieu favorable en dissolvant le protéolysat Ronchèse en poudre dans l'eau distillée (2 g de poudre p. 100) ; on ajoute 2 g p. 1 000 de glucose et 8 g p. 1 000 de gélose. Le milieu peut être utilisé comme bouillon si l'on supprime la gélose.

Le pH est ajusté à 7,2-7,4, à l'aide de soude diluée ; au cours de cette opération, lorsqu'on passe en milieu alcalin, certains sels alcalino-terreux présents dans le protéolysat précipitent ; on les élimine par filtration à chaud.

On obtient un milieu semblable avec le protéolysat Oberval en mélangeant 10 cm³ de solution Oberval à 90 cm³ d'eau distillée, ce qui correspond approximativement au même taux d'azote que pour le premier milieu, soit environ 3 p. 1 000 (en azote total).

L'étude des différents germes, une dizaine environ, a été menée dans l'esprit du *Manuel de détermination des Bactéries anaérobies*, d'A.-R. Prévot [5]. Nous avons toujours réalisé l'anaérobiose en ensemençant dans le milieu régénéré, en faisant le vide et en scellant les tubes.

Les cultures sur gélose profonde se sont montrées identiques en tous points à celles obtenues sur milieu V. F. ; les colonies sont parfaitement isolées et leur morphologie correspond à la description donnée dans le Manuel.

Peut-être se montrent-elles plus généralement ouatées et plus grosses. La morphologie n'a pas été perturbée, les bactéries conservant leurs formes et leur arrangement.

L'étude biochimique s'est révélée identique dans ses conclusions à celle obtenue sur milieu V. F., en ce qui concerne le pouvoir réducteur, le pouvoir gazogène, le pouvoir protéolytique, la fermentation des sucres, la réduction des nitrates.

Les produits terminaux de la fermentation sur protéolysat à 2 p. 1 000 glucosé à 10 p. 1 000 sont les mêmes dans le cas d'une bactérie donnée que ceux obtenus dans le service du D^r Prévot.

Les acides volatils sont identiques qualitativement ; tout au plus doit-on noter une légère différence dans le rapport de ces acides volatils, et encore cette différence ne se remarque-t-elle que pour certains micro-organismes.

Le phénomène est accompagné d'une acidité volatile totale plus grande que sur milieu V. F. et, d'une façon générale, d'un taux d'azote ammoniacal nettement supérieur.

Un tel milieu semble pouvoir donner des résultats satisfaisants, compte tenu de la facilité avec laquelle on l'obtient.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT. *Les microbes anaérobies*, Masson, Paris, 1937.
- [2] L. H. STICKLAND. *Biochem. J.*, 1935, **29**, 288.
- [3] G. COHEN-BAZIRE. *Thèse Doct. Sci.*, Paris, 1950.

- [4] Ch. HAQUIN et G. AUFAUVRE. *Sur le traitement de l'anorexie des nouveau-nés par les protéolysats*. Notice des Laboratoires Oberval, Paris.
- [5] A.-R. PRÉVOT. *Manuel de Classification et de Détermination des Bactéries anaérobies*, Masson, Paris, 1948.

EXTRACTION DE LA TOXINE DE *CL. CHAUVÆI* A PARTIR DES CORPS MICROBIENS

par MIR CHAMSY et M. RAYNAUD.

(Institut Pasteur. Service des Anaérobies.)

L'un d'entre nous a montré que l'on pouvait extraire certaines exotoxines à partir des corps microbiens lavés [4]. Nous avons étendu cette étude au cas de *Cl. chauvæi*.

Les cultures ont été faites à 37°, soit en bouillon Vf glucosé à 2 p. 1 000 réparti en Erlenmeyer de 1 l, soit en milieu à base de digestion papaïnique de viande de bœuf réparti en flacons de 5 l munis de tubes à prélèvements. Les corps microbiens sont recueillis par centrifugation à 0° après un, deux ou quatre jours de culture. Ils sont lavés trois fois à l'eau distillée. Les liquides de lavage sont rendus isotoniques par addition de chlorure de sodium et injectés à la souris par voie intraveineuse.

Les corps microbiens lavés sont mis en suspension dans un volume de solution saline hypertonique ($\text{NaCl } \frac{\text{M}}{4}$, Citrate de sodium $\frac{\text{M}}{10}$) égal au $\frac{1}{10}$ ou au $\frac{1}{40}$ du volume de bouillon initial, et abandonnés à 0°

TABEAU I.

	DURÉE DE CULTURE		
	1 jour	2 jours	4 jours
DMM totales (pour 1 l de bouillon) :			
Bouillon	2 000	4 000	8 000
1 ^{er} lavage (125 cm ³) . .	< 250	< 250	< 250
2 ^e lavage	< 250	< 250	< 250
3 ^e lavage	< 250	< 250	< 250
Extrait (50 cm ³) . . .	250	200	70
Azote total (mg/cm ³) :			
Suspension	1,52	1,34	
Extraits (dialysés) . .	0,28	0,18	0,24

pendant trois jours. Après ce délai, la suspension est centrifugée. Le liquide surnageant est dialysé à 0° pendant deux jours, contre de l'eau physiologique. Le volume après dialyse est noté et le liquide obtenu est injecté à la souris par voie intraveineuse. La dose minima mortelle est déterminée sur souris de 20 g : le délai d'observation a été fixé à quatre heures : en général, la mort survient cinq à dix minutes après l'injection. L'azote total des suspensions et des extraits a été déterminé par la méthode de Kjeldahl.

Résultats. — 1° Culture en bouillon Vf :

Les résultats rapportés au tableau 1 correspondent au nombre total de D. M. M. contenues dans 1 l de bouillon et dans les eaux de lavage ou les liquides d'extraction obtenus en traitant les corps microbiens provenant de 1 l de bouillon.

2° Culture en milieu « papaïnique » :

	DURÉE DE CULTURE	
	1 jour	4 jours
DMM totales (pour 1 l de bouillon) :		
Bouillon.	5,000	4,000
1 ^{er} , 2 ^e et 3 ^e lavages (250 cm ³). . .	< 500	< 500
Extrait (100 cm ³).	300	200
Azote total (mg/cm ³) :		
Suspension.	1,18	0,98
Extraits (dialysés).	0,16	0,16

Les eaux de lavage ne contiennent que des quantités de toxine très faibles ou nulles, si bien qu'on ne peut pas les mettre en évidence par inoculation à la souris.

Les extraits contiennent des quantités décelables mais faibles de toxine. La quantité de toxine que l'on peut ainsi mettre en évidence ne représente qu'une très faible proportion de la toxine totale. Il s'agit bien de la même toxine, car la toxicité des extraits est neutralisée par le sérum anti-*Clostridium chauvœi*.

La toxine de *Cl. chauvœi* peut être décelée dans des extraits de corps microbiens lavés. Mais dès la vingt-quatrième heure de culture, la proportion de toxine présente dans les corps microbiens est très faible. La toxine de *Clostridium chauvœi* diffuse donc rapidement dans le milieu au cours même de la croissance des germes.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] M. RAYNAUD. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 543 ; ces *Annales*, 1951 (sous presse).

ÉTUDE SUR *ACTINOBACTERIUM MEYERI* P. 1938

par R. VINZENT et H. TATAKI.

(Institut Pasteur, Service des Anaérobies
et Laboratoires des Hospices Civils du Havre.)

En 1911, Kurt Meyer [4] avait décrit très sommairement un Actinomycète anaérobie Gram-positif qu'il avait isolé du pus fétide d'un empyème. Il ne l'avait pas nommé et le classait parmi les espèces du genre *Cohnistreptothrix*, tombé aujourd'hui en désuétude. Considérant son individualité bien établie par sa sérophilie obligatoire, son absence de gaz et d'odeur en culture, le trouble homogène en bouillon ascite et la brièveté de sa vie en culture, il a été classé parmi les *Actinobacterium* et nommé *A. meyeri* par A.-R. Prévot [2] ; ce dernier a trouvé par la suite deux souches qu'il n'a pas pu étudier complètement avant leur disparition rapide en culture. La variété décrite par Reynes, en 1947, s'éloignait assez de l'espèce-type et ses caractères ne peuvent pas être retenus pour elle.

Dans un cas récemment étudié par nous de pyorrhée alvéolaire, nous avons isolé par gingivo-culture deux anaérobies : *Corynebacterium diphtheroides* et *Actinobacterium meyeri*. Malgré l'extrême difficulté d'obtenir des cultures en bouillon Vf additionné de sérum, nous avons pu étudier complètement la souche d'*A. meyeri* dont voici la description :

Morphologie. — Bâtonnet de 2 à 5 μ , sur 0,4 à 0,5 μ ; avec ramifications primaires et secondaires et renflements terminaux. Formes filamenteuses rares. Immobile, asporulé ; ni cil, ni capsule ; Gram-positif.

Physiologie. — Anaérobie strict ; tué par un chauffage à 60°.

Longévité : un mois et demi en milieu de R. Vincent, de cinq à six jours en bouillon Vf + sérum. Très réducteur : rouge neutre et safranine réduits.

Cultures. — Sérophile obligé ; non gazogène ; inodore.

Gélose profonde + sérum : colonies lenticulaires de petite taille.

Eau peptonée + sérum : trouble fin, léger dépôt.

Bouillon Vf glucosé + sérum : trouble homogène en quarante-huit heures.

Gélatine : non liquéfiée ; lait : non coagulé.

Protéines coagulées : non attaquées.

Glucides : seul le lévulose est lentement et faiblement fermenté.

Biochimie. — Nitrates non réduits en nitrites. Sulfites non réduits en sulfures.

La fermentation du bouillon Vf + sérum produit : NH_3 , amines volatiles, aldéhydes ; cétones ; indol ; scatol ; traces d' SH_2 et les acides formique, propionique et lactique.

Pouvoir pathogène. — La souche 618 A ne provoquait aucune lésion chez le cobaye. Elle ne produisait ni toxine, ni hémolysine.

CONCLUSION. — Cette étude montre que *A. meyeri* est un actinomycète anaérobie sérophile obligé, troublant les milieux, ni gazogène ni fétide, de vie très brève, non protéolytique et très peu glucidolytique, ferment formo-propionique-lactique, non pathogène en culture pure pour le cobaye. Ces caractères le distinguent d'*A. cellulitis*, d'*A. israeli* et d'*A. abscessus*, et permettent de le considérer définitivement comme une espèce autonome.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Cité par WEINBERG, NATIVELLE et PRÉVOT. *Les microbes anaérobies*, 614.
[2] A.-R. PRÉVOT. *Manuel de Classification des Anaérobies*. 2^e édit., p. 251.

VARIABILITÉ
DE LA PRODUCTION ET DE LA DESTRUCTION
DE L'ACÉTYL-MÉTHYL-CARBINOL (ACÉTOÏNE)
PAR CERTAINES BACTÉRIES ANAÉROBIES SPORULÉES

par H. BEERENS et J. GUILLAUME.

(Institut Pasteur de Lille.)

Depuis que A.-R. Prévot a montré l'importance de la recherche de l'acétoïne pour la détermination des bactéries anaérobies [1], nous avons recherché systématiquement ce corps au cours de nos identifications microbiennes (technique de Lemoigne) [2]. Nous nous sommes rapidement aperçus que nous ne mettions jamais en évidence d'acétoïne dans nos cultures en milieu au placenta glucosé à 1 p. 100 alors que, pour les mêmes souches, nous en décelions des quantités appréciables en bouillon nutritif ordinaire glucosé (1 p. 100) et aussi, mais en moins grande quantité, en milieu V. F. glucosé (1 p. 100). Nous nous sommes proposé d'étudier les causes de ces divergences. Nous avons vérifié :

- 1° La variabilité de la production de l'acétoïne suivant la nature du milieu ;
- 2° La disparition, au cours de la culture, de l'acétoïne introduite dans différents milieux ;
- 3° L'action des bactéries dites non proliférantes sur l'acétoïne.

TECHNIQUES UTILISÉES. — L'acétoïne a été obtenue, soit par distillation d'une culture d'*Aerobacter* sur milieu de Clark et Lubs, soit par oxydation par le brome du 2.3 butylène-glycol, suivant la méthode de Hooreman [3]. Le produit obtenu par l'une ou l'autre de ces méthodes nous a donné des résultats comparables.

Le dosage de l'acétoïne a été effectué selon la méthode de Prill et Hammer [4].

5 ou 10 cm³ de culture sont distillés à sec en présence de perchlorure de fer, et le distillat recueilli dans 1 cm³ de la solution suivante : acétate

de Na, 70 g; hydroxylamine, 25 g; eau qs. p. 1 000 cm³, est complété à 15 cm³. On chauffe une heure au bain-marie à 80°. On ajoute immédiatement 1 cm³ de la solution : phosphate bipotassique, 144 g; acétone, 200 cm³; eau, qs. p. 1 000 cm³. On laisse dix minutes à la température du laboratoire, on ajoute 0,3 cm³ de solution d'ammoniaque, 2,2 cm³ d'une solution de tartrate sodico-potassique à 90 g p. 50 cm³ d'eau et 0,2 cm³ de solution de sulfate ferreux à 5 p. 100 dans l'acide sulfurique à 1 p. 100. Il se développe une teinte rose dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'acétoïne présente.

Nous avons pratiqué le dosage par comparaison avec la teinte d'une solution formolée à concentration croissante de phénolsulfonephtaléine tamponnée à pH 7,7, conservée en tubes scellés. Cette gamme est elle-même étalonnée avec une solution de diméthylglyoxime.

Solution de P.S.P. à 2 p. 100 à introduire dans 10 cm³ de solution à pH 7,7 formolée.

Doses correspondantes d'acétoïne en mg dans 15 cm³.

0,011 0,027 0,083 0,15 0,23 0,52 0,69

0,01 0,02 0,05 0,1 0,2 0,5 1

Cette méthode permet de doser facilement 0,02 mg à 0,5 mg d'acétoïne contenus dans 10 cm³ de culture utilisés comme prise d'essai, soit 2 à 50 mg par litre. Le dosage, par la méthode de Lemoigne, n'est possible qu'à la concentration de 6 mg par litre, à la condition d'opérer sur 100 cm³ de culture.

Nos essais ont porté sur trois souches : *W. perfringens*, *Inflabilis indolicus*, *Clostridium sporogenes*. Les cultures ont été pratiquées, soit en tubes scellés sous vide, soit en atmosphère d'azote et à la température de 37° C.

I. MISE EN ÉVIDENCE DES DIFFÉRENCES DE PRODUCTION ET DE LA DISPARITION DE L'ACÉTOÏNE EN FONCTION DU MILIEU DE CULTURE. — Le tableau ci-dessous rapporte les résultats obtenus avec la souche de *W. perfringens*, cultivée sur bouillon nutritif et sur bouillon de placenta glucosés à 1 p. 100 (l'utilisation de milieux tamponnés par du phosphate bipotassique à 2 p. 1 000 nous a donné les mêmes résultats).

Afin de doser les quantités d'acétoïne inférieures à 2 mg par litre de culture, nous avons distillé 100 cm³ de culture et recueilli 10 cm³ sur lesquels nous avons effectué le dosage.

DURÉE d'incubation à 37° C	BOUILLON NUTRITIF glucosé à 1 p. 100		BOUILLON DE PLACENTA glucosé à 1 p. 100	
	Acétoïne en mg par litre	Réaction de Lemoigne	Acétoïne en mg par litre	Réaction de Lemoigne
0.	2,4	Négative.	0	Négative.
5 heures	3,8	»	1	»
21 heures	4,4	»	1,8	»
43 heures	8	Positive.	2,4	»
72 heures	10	Positive.	3	»
5 jours	8	Positive.		»
7 jours	4	Négative.	0,4	»
9 jours	3,8	»		»

Ces résultats montrent que :

1° Le bouillon nutritif glucosé non ensemencé contient 2,4 mg d'acétoïne par litre, alors que le bouillon de placenta glucosé n'en contient pas.

2° La quantité d'acétoïne produite augmente rapidement pour atteindre un maximum au troisième jour de la culture. La quantité d'acétoïne accumulée est environ trois fois plus grande en bouillon nutritif glucosé qu'en bouillon de placenta.

3° La disparition de l'acétoïne est plus rapide en milieu au placenta qu'en bouillon nutritif. Sur milieu au placenta, au septième jour de la culture, 87 p. 100 de l'acétoïne produite sont disparus alors que 60 p. 100 disparaissent dans le même temps en bouillon nutritif.

II. DISPARITION DE L'ACÉTOÏNE AU COURS DE LA PROLIFÉRATION BACTÉRIENNE. — *W. perfringens*, *I. indolicus*, *Cl. sporogenes* ont été ensemencés sur milieu au placenta et sur bouillon nutritif non glucosés contenant 12 mg d'acétoïne par litre. Les cultures ont été effectuées à 37° C en tubes scellés sous vide, les dosages d'acétoïne pratiqués sur 10 cm³ de milieu.

Sur milieu au placenta : *W. perfringens*, *I. indolicus*, *Cl. sporogenes* font disparaître la totalité de l'acétoïne ajoutée après douze heures d'incubation (réaction de Prill et Hammer, négative).

Sur bouillon nutritif : *I. indolicus* et *Cl. sporogenes*, réaction de Prill et Hammer négative après douze heures d'incubation. *W. perfringens* ne fait disparaître la totalité de l'acétoïne ajoutée qu'après cinq jours d'incubation.

Ainsi, *W. perfringens*, considéré comme producteur d'acétoïne, fait disparaître ce corps beaucoup plus lentement que les deux autres espèces qui, classiquement, n'en produisent pas.

III. ACTION DES BACTÉRIES DITES NON PROLIFÉRANTES SUR L'ACÉTOÏNE. — Trois lots de 200 cm³ d'une culture d'*I. indolicus*, de *Cl. sporogenes* et de *W. perfringens*, âgée de cinq jours, sont centrifugés.

Lot n° 1 : Le culot de centrifugation est mis en suspension dans 4,5 cm³ d'eau salée physiologique.

Lot n° 2 : Les bactéries sont lavées une fois à l'eau salée, recueillies par centrifugation et mises en suspension dans 4,5 cm³ d'eau salée.

Lot n° 3 : Les bactéries sont lavées deux fois, recueillies par centrifugation et mises en suspension dans 4,5 cm³ d'eau salée.

Dans chaque cas, les liquides surnageants recueillis sont filtrés sur bougie Chamberland L3.

A chacune des suspensions bactériennes, et aussi à chaque fraction de liquide surnageant filtré, on ajoute une solution d'acétoïne de manière à obtenir une concentration de 24 mg par litre. Les essais sont divisés en deux séries incubées à 37° C : l'une en tubes scellés sous vide, l'autre à l'air libre.

1° *Suspensions bactériennes*. — Résultats : En tubes scellés sous vide, les bactéries non lavées (lot n° 1) font disparaître l'acétoïne très rapidement ; après trois jours, aucune trace d'acétoïne n'est décelable, aussi bien dans les suspensions d'*I. indolicus* et de *Cl. sporogenes* que dans celles de *W. perfringens*.

Les bactéries lavées une fois (lot n° 2) ou deux fois (lot n° 3) ne font plus disparaître l'acétoïne que l'on retrouve au taux de 24 mg par litre.

En aérobiose, les bactéries non lavées ne font pas disparaître l'acétoïne après huit jours d'incubation à 37° C.

2° *Liquides surnageants*. — En aucun cas (sous vide ou à l'air libre), nous n'avons constaté la disparition de l'acétoïne.

Ces essais montrent :

1° Que la disparition de l'acétoïne est liée à un processus d'oxydo-réduction où entrent en jeu donateurs et accepteurs d'hydrogène apportés par l'émulsion bactérienne insuffisamment lavée ;

2° Que ce processus ne se réalise qu'en anaérobiose ;

3° Que les filtrats de culture ne semblent pas contenir d'enzymes responsables de cette disparition.

Ces faits ont déjà été signalés pour les bactéries aérobies du groupe *Aerobacter* (Tittsler) [5] et du groupe *subtilis-megatherium* (Hooreman et collaborateurs) [6].

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — 1° La production d'acétoïne varie avec la nature du milieu. Il semble que les différences observées soient liées à la nature de la source d'azote. Ce fait a été signalé déjà par Hooreman et ses collaborateurs [6]. Nous publierons ultérieurement nos résultats sur ce sujet.

2° Au cours de la prolifération microbienne, l'acétoïne disparaît très rapidement dans le milieu au placenta non glucosé, que les souches soient ou non productrices d'acétoïne. En bouillon nutritif ordinaire, au contraire, les souches normalement productrices d'acétoïne le font disparaître moins rapidement que les souches non productrices.

3° Les suspensions bactériennes font disparaître l'acétoïne en anaérobiose, à la condition de ne pas être lavées au préalable. Un seul lavage suffit à empêcher ce phénomène.

4° Les filtrats de culture ne possèdent pas la propriété de faire disparaître l'acétoïne.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A.-R. PRÉVOT et J. TAFFANEL. *Ann. Ferment.*, 1943, **8**, 1.
- [2] M. LEMOIGNE, B. DELAPORTE et M. CROSON. *Ces Annales*, 1944, **70**, 65.
- [3] M. HOOREMAN. *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 208.
- [4] E. A. PRILL et B. W. HAMMER. *J. Sci.*, 1938, **42**, 385.
- [5] Ralph P. TITSLER. *J. Bact.*, 1938, **35**, 157.
- [6] M. HOOREMAN, J.-P. AUBERT, M. LEMOIGNE et J. MILLET. *Ces Annales*, 1950, **78**, 1.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE D'UNE ESPÈCE ANAÉROBIE *BIFIDIBACTERIUM CORNUTUM* (DISTASO) P. 1939

par P. TARDIEUX et H. BEERENS.

(Services des Anaérobies des Instituts Pasteur de Paris et de Lille.)

Les bactéries anaérobies du genre *Bifidibacterium* sont, en règle générale, difficiles à isoler et à cultiver. Aussi, seule l'espèce type, *B. bifidum*, a-t-elle fait l'objet d'une description complète, les autres restant assez mal connues [1].

Récemment, l'un de nous, recherchant dans un cas de javart du



Bifidibacterium cornutum. Photomicrographie Manigault. $\times 1\,200$.

cheval, l'agent étiologique habituel, *Spherophorus necrophorus*, n'a rencontré qu'une flore d'accompagnement ou de surinfection composée principalement d'aérobies banaux et d'un anaérobie Gram positif, que ses caractères morphologiques et culturels nous ont amenés à identifier à *Bifidibacterium cornutum*. Cette occurrence nous permet de compléter la description originale sommaire, donnée en 1912 par Distaso.

Morphologie. — C'est un petit bâtonnet polymorphe et irrégulier, dont les dimensions moyennes sont de 2 à 3 μ de long et 0,3 de large. Il est souvent bifurqué ou doublement bifurqué, ce qui donne des figures tout à fait caractéristiques en « bois de cerf ». Parfois, la bifurcation est remplacée par une simple angulation. Les extrémités sont souvent terminées par un petit renflement. D'autres renflements se situent de préférence aux points de bifurcation et d'angulation : dans les cultures âgées ils deviennent plus nombreux et plus volumineux, tandis que l'aspect ramifié s'accroît (fig. 1).

La coloration de Gram est nettement positive chez les bactéries jeunes,

mais devient irrégulière dans les cultures âgées, où l'on trouve des formes sphéroïdes Gram négatives.

Physiologie. — C'est un anaérobie strict, peu résistant à la chaleur, puisqu'il est tué par un chauffage de cinq minutes à 60°. Sa longévité ne dépasse pas quinze jours. Il est très réducteur : rouge neutre et safranine sont très rapidement et définitivement virés.

Cultures. — Elles sont difficiles à obtenir et il faut ajouter au bouillon VF des facteurs de croissance, tels que ceux du sérum frais ou de l'extrait de cervelle pour obtenir un trouble homogène appréciable. Il n'y a pas de dégagement gazeux, mais les cultures ont une odeur fétide modérée.

En gélose profonde VF, on obtient des colonies sphériques de 1/2 mm. Pas de pouvoir protéolytique ni gélatinolytique et le lait n'est pas modifié.

Les milieux sucrés sont acidifiés, en particulier, le glucose, le galactose et le saccharose, et, à un degré moindre, le lévulose, le lactose, le maltose, l'amidon et la glycérine.

Biochimie. — Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites. La fermentation du bouillon VF glucosé produit les acides acétique et lactique, SH_2 , NH_3 , et des cétones.

Pouvoir pathogène. — L'inoculation au lapin, au cobaye, à la souris a été parfaitement tolérée.

Il n'y a ni toxine ni hémolysine dans les milieux de cultures.

Position dans la systématique. — Ces caractères permettent d'individualiser très nettement *B. cornutum* qui est, en définitive, un anaérobie peptolytique, glucidolytique, ferment acéto-lactique, non pathogène et ainsi de le distinguer des autres espèces du genre *Bifidum*, au demeurant assez voisines de lui.

L'absence de coagulation du lait le sépare de *B. bifidum* et *B. appendicitis*, sa petite taille, de *B. appendicitis* et *B. bifurcatum*, l'aspect des cultures en bouillon, de *B. constellatum* et *B. intestinalis*.

BIBLIOGRAPHIE

[1] A.-R. PRÉVOT. *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2^e édit., 1948, 255.

DEUX CAS DE MORVE CHRONIQUE HUMAINE TRAITÉS PAR LES SULFAMIDES

par M. ANSARI et M. MINOU.

(Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine, Téhéran.)

Le regretté R. Legroux avait, à plusieurs reprises, attiré notre attention sur la recherche de la morve humaine en Iran, méconnue à cause du caractère occulte des cas d'infection chronique, mais probable à cause de la fréquence de la morve animale.

Nous avons eu l'occasion d'observer deux de ces cas.

PREMIER CAS. — En mai 1949, notre confrère le Dr Petrossian, chef de service à l'Hôpital du Chemin de Fer à Téhéran, nous appelait en consultation pour le diagnostic d'un malade alité dans son service depuis plusieurs semaines. Il s'agissait d'un jeune homme de 22 ans, ouvrier affecté à la réparation des rails sur la ligne d'Arak, entré à l'Hôpital du Chemin de Fer pour fièvre continue.

L'interrogatoire du malade, répondant par monosyllabes et de façon souvent contradictoire, ne donnait rien de précis. Nous avons eu connaissance d'une pneumonie, contractée quatre mois auparavant ; après guérison, le malade reprenait son travail pendant un mois, pour être de nouveau interrompu par de la fièvre et une angine ulcéro-membraneuse, traitée avec des sulfamides au dispensaire local. Le malade reprend ensuite son travail, pour quinze jours seulement, car il éprouvait toujours des malaises et un état fébrile. Le 10 mai 1949, il devait s'aliter de nouveau.

L'examen du malade ne montrait rien de particulier. Aucun symptôme du côté des poumons et du cœur, pas de splénomégalie ni d'hépatomégalie. Seuls symptômes : fièvre oscillant entre 39-40° le soir et 37,5-38° le matin ; tumeur fluctuante au front, d'allure torpide, et gêne de la déglutition, avec persistance d'une ulcération de la gorge.

Les examens de laboratoire pour la recherche d'hématozoaires, spirochètes, ainsi que les hémocultures pratiquées par nous pour recherche de brucellose et de fièvres typhoïdiques restent négatifs. La formule leucocytaire ne montre rien de particulier, en dehors d'une légère leucocytose et polynucléose.

Quinze jours après son entrée à l'hôpital, le malade commence une arthrite avec tuméfaction de l'articulation du coude et une seconde tuméfaction au front, constituée par un nodule intradermique s'abcédant lentement, alors que la première lésion frontale commence à s'ouvrir. Liquide séro-purulent jaune ; absence de germes à l'examen direct, pratiqué plusieurs fois.

La radiographie de l'articulation du coude montre des abcès sous-périostés.

Des cultures sont faites à partir du pus des abcès frontaux sur les milieux usuels : bouillon, gélose nutritive en aérobiose et anaérobiose. Ces cultures restent négatives. En même temps sont inoculés 6 souris, 4 cobayes et 2 rats.

Les souris. — Inoculées dans le péritoine, elles présentent, après une incubation de trois à quatre jours, une élévation de température de quatre à cinq jours de durée avec chute en lysis. Elles meurent entre le vingt-cinquième et le quarantième jour après l'inoculation. A l'autopsie des animaux morts ou sacrifiés, on note des abcès multiples et des abcès punctués à la surface de la rate. Le foie ne présente pas d'hypertrophie ; mais montre, chez certains de ces animaux, des abcès semblables aux abcès spléniques. Des passages sont pratiqués sur une deuxième série de souris qui meurent en montrant une généralisation granulique, consécutive probablement aux abcès spléniques ouverts dans le péritoine. Certains animaux présentent des abcès dans le rein et des orchites métastatiques. L'examen histologique de la rate montre, en dehors des micro-abcès, une nécrose des tissus spléniques et le foie présente une dégénérescence graisseuse.

Les cultures de broyat de rate ont été faites sur bouillon ordinaire et gélose. Un tube de gélose présente une seule colonie au bout de quatre jours. Il s'agit de bacilles immobiles relativement grêles, se colorant mal, ne prenant pas le Gram, à coloration bipolaire, de 2 à 5 μ de dimension, et en général accolés 2 à 2. Certains de ces bacilles étaient incurvés.

Repiquage sur gélose nutritive. Après vingt-quatre heures, nombreuses colonies séparées, rondes, de forme régulière, sur tout le trajet d'ensemencement. D'abord légèrement transparentes, les colonies deviennent confluentes et opaques après soixante-douze heures.

Cobayes. — Inoculation sous-cutanée. Abcès au point d'inoculation, adénite généralisée, particulièrement ganglions de la chaîne dorso-lombaire. Les ganglions se ramollissent, mais ne s'abcèdent pas ; certains d'entre eux rétrocedent spontanément. La mort survient après trente à cinquante jours. A l'autopsie, on note chez 2 cobayes une généralisation de petits abcès dans les poumons, la rate et le foie.

Les cultures, à partir des ganglions de cobayes, ont été faites sur gélose ordinaire, bouillon au foie en aérobiose et anaérobiose. Les milieux anaérobies sont restés négatifs. Le bouillon montre un trouble homogène, avec dépôt au fond du ballon après quarante-huit heures. Sur gélose, 2 colonies après quarante-huit heures. Ces germes n'ont donné de belles cultures sur la gélose qu'après 3 repiquages.

Pour nous assurer que le germe obtenu à partir des organes de souris et de cobayes n'appartenaient pas au groupe des bacilles pseudo-tuberculeux de ces rongeurs, en dehors des hémocultures aérobies et anaérobies qui sont restées négatives, nous avons répété les ensemencements et inoculations en partant du pus obtenu par ponction de l'articulation du genou de notre malade, sur bouillon au foie, bouillon ordinaire, gélose au sang, gélose à la pomme de terre glycinée, pomme de terre glycinée et milieu de Dorset. Sur les milieux à la pomme de terre glycinée et sur le Dorset, nous avons pu obtenir, après quarante-huit à soixante-douze heures, des colonies d'aspect crémeux, légèrement saillantes, régulières, isolées ou confluentes.

Après une semaine, la culture sur pomme de terre et milieu de Dorset est devenue brunâtre, chocolatée. La pomme de terre a bruni sur toute sa surface, et en profondeur, après une semaine. Nous avons repris l'étude de la souche microbienne isolée à partir des souris et cobayes de la première série ; nous avons alors retrouvé les mêmes caractères macroscopiques des cultures, et microscopiques des germes.

Les inoculations intrapéritonéales de ce pus aux cobayes nous ont donné les résultats suivants : formation d'abcès purulents au point d'inoculation, élévation de la température après le troisième jour et pendant dix à quarante jours. La plupart des cobayes succombent. Deux d'entre eux meurent deux heures après l'inoculation, avec signes de péritonite sans lésions viscérales. Chez un de ces cobayes, on note une orchite, avec la peau de la bourse rouge violacé, orchite qui rétrocéda spontanément. Chez un autre cobaye, nous avons trouvé une polyarthrite des deux pattes postérieures.

Les cultures effectuées à partir des organes des cobayes ou des souris ont été inoculées aux souris et aux cobayes. Les résultats de ces inocu-

lations ont été presque identiques à ceux obtenus par l'inoculation du pus de notre malade.

Pour compléter cette série d'expériences, nous avons inoculé dans la cavité péritonéale une série de cobayes, même âgés. Cette inoculation a été faite à partir des cultures obtenues avec le pus de l'articulation du genou. Nous avons ainsi obtenu une vaginalité très nette ; les testicules restaient bloqués (signe de Straus).

Nous avons conclu de l'aspect microscopique de ce germe, de ses caractères culturels et de son tableau expérimental, au diagnostic de bacille de la morve. Les épreuves de séro-agglutination (1/80), fixation de complément et l'intradermo-réaction à la malléine ont nettement confirmé ce diagnostic.

Traitement. — Avant que ce diagnostic ait pu être établi, différents traitements avaient été administrés au malade.

Salicylate de soude seul ou associé à la pénicilline, salicylate et auto-hémothérapie, traitements vitaminés, urotropine, extraits hépatiques, streptomycine pendant trente jours, électargol, de nouveau pénicilline, vaccin antipyogène ; tous ces traitements sans aucun résultat. Devant cet insuccès thérapeutique, on laissa le malade sans traitement.

A cette époque, M. Legroux, qui se trouvait en mission en Iran pour la question de la morve des chevaux de l'armée, avait suggéré comme traitement de la morve des injections d'anamorve combinées à la chimiothérapie par les sulfamides (1).

Dès que le diagnostic de morve fut posé et confirmé, nous avons appliqué le traitement en question, à l'exclusion de l'anamorve que nous n'avions pas à notre disposition. A partir du 20 octobre, le malade reçut 6 g de sulfadiazine par jour, en tablettes ; après quarante-huit heures de ce traitement, la fièvre était tombée à 36°5. Les sulfamides furent administrées pendant dix jours de suite. Avec cette première cure, les tuméfactions rétrocedèrent sans abcéder, les abcès du front, des avant-bras et des jambes se cicatrisèrent, le malade reprit 10 kg de poids en vingt-cinq jours et recommença à marcher. Il reçut au total trois traitements de sulfadiazine, de dix jours chacun, à raison de 6 g par jour, avec intervalles de dix jours de repos.

Actuellement, ce malade a repris son travail et ne présente plus aucun symptôme apparent de son ancienne maladie.

DEUXIÈME CAS. — Il s'agit d'une paysanne âgée de 32 ans, mère de trois enfants. Après huit mois de fièvre, elle se présente à nous, cachectique et portant des abcès multiples sur le flanc, les pieds et une jambe. Rien ne peut être noté de plus à l'examen clinique de cette malade. Nous apprenons que sa sœur est morte un an plus tôt de la même maladie, qu'elle et sa famille vivent à la campagne, possédant un âne pour tout bétail. Aucun signe apparent de cette maladie chez le mari et les enfants.

A la radiographie des poumons, rien de particulier. Les analyses du sang pour recherche de parasites, hémoculture, réaction de Bordet-

(1) Des essais de ce traitement sur cobayes avaient été commencés à l'Institut d'Hessarek par le Dr DELPY et avaient donné des résultats très satisfaisants (communication verbale).

Wasserman restent négatives. A l'examen direct du pus des abcès, absence de B. K. et d'autres germes. Nous remémorant l'aspect clinique de notre première observation, nous inoculons, dès le premier jour, des cobayes mâles et des souris, et pratiquons des cultures sur pomme de terre glycinée et milieu de Dorset. Les caractères de ces cultures correspondent à ceux des bacilles de la morve ; les cobayes inoculés présentent une orchite caractéristique. L'épreuve de séro-agglutination et de fixation du complément, ainsi que l'intradermo-réaction à la malléine, sont positives. Cette dernière réaction est également positive chez le mari de notre malade, apparemment bien portant.

Le traitement par sulfadiazine, comme pour le cas précédent, est aussitôt institué. Après un mois, la fièvre et les abcès rétrocedent. La malade a repris 12 kg en l'espace de trois mois et n'a présenté aucune récurrence après six mois d'observation.

CONCLUSION. — 1° Les cas de morve chronique d'allure torpide doivent être assez fréquents dans notre pays, puisqu'en deux ans nous avons pu en diagnostiquer 2 cas chez l'homme.

2° La souris est aussi sensible que le cobaye à la morve expérimentale.

3° Ayant appliqué les idées de R. Legroux pour le traitement de cette maladie, nous avons pu guérir nos deux malades avec trois cures de sulfadiazine, à raison de 6 g par jour pendant dix jours. Les malades en question n'ont pas présenté de récurrence.

MÉTHODE APPORTANT UNE CERTAINE PRÉCISION POUR LA MESURE DE L'ACTIVITÉ D'UN ANTIBIOTIQUE

par L. DUCHON.

(Laboratoire de Secteur. Hôpital Trousseau.)

Il nous est apparu que dans certaines conditions l'on avait intérêt à avoir plus de précision dans la recherche de l'activité d'un antibiotique. Les différentes méthodes usitées ne peuvent nous fournir, en ce domaine, qu'une mesure relativement peu précise. Il est habituel, en effet, de se contenter de la fixation du point maximum de la clarification d'une culture. Or, entre ce point et la végétation que donne une culture témoin, il reste toute une gamme qui nous paraît inexplorée jusqu'ici.

Voici donc, pour pratiquer cette exploration, la méthode que nous proposons, basée sur la numération des colonies apparaissant dans des cultures préparées identiquement, mis à part le taux d'antibiotique.

Pour ce faire, il convient d'avoir à sa disposition :

1° Des plaques de métal (aluminium), 9 cm × 12 cm, épaisseur 4 mm.

La plaque est perforée symétriquement de 12 trous cylindriques de 2 cm de diamètre.

Pour leur utilisation, ces plaques sont stérilisées par simple passage sur bec Mecker (maintenues par une pince qui s'engage dans une rainure creusée sur le long côté de la plaque).

Encore chaude, l'une des faces est appliquée sur un bloc plan de paraffine stérilisée, puis posée sur une lame de verre, de même dimension, préalablement flambée. La prise se fait rapidement. L'on recouvre aussitôt d'une autre lame de verre flambée. Ainsi, l'on réalise d'un coup douze boîtes de Petri « miniatures ». Un peu d'habitude permettra une réussite parfaite.

2° De la gélose (à 8 à 10 p. 100 de gélose), liquéfiée et refroidie au bain-marie à 45°.

3° Du milieu liquide (bouillon T), bien uniforme. En principe, toute expérimentation devra se faire avec un même ballon, une légère variation du pH, une peptone différente pouvant nuire gravement à la précision des résultats.

4° On n'utilisera que de la verrerie neutre (dûment vérifiée), rincée à l'eau distillée chaude.

5° Le germe à étudier sera préparé et réparti dans des conditions très précises. Il conviendra :

a) D'utiliser des souches jeunes (*Staphylococcus aureus* vingt-quatre heures, *Streptococcus hemolyticus* dix-huit heures).

b) De doser les suspensions microbiennes par néphélométrie.

c) De les agiter fortement dans un ballon à perles de verre afin de disloquer au mieux amas, grappes et chaînettes.

d) Enfin, de les filtrer sur papier serré stérile ; pour homogénéiser la suspension microbienne, nous utilisons le filtre à filtration lente Durieux.

A l'aide des plaques, l'on comprend aisément que l'on aura tôt fait de trouver, une fois pour toutes pour le même milieu, la dilution optimum de la culture permettant une facile numération.

Par la suite, la néphélométrie donnera, d'une séance à l'autre, une approximation suffisamment précise. De plus, ces plaques permettent, avec la plus grande aisance, de vérifier la régularité, la précision des résultats, enfin de vérifier en particulier le bien-fondé de la méthode par l'absence de souillures.

Dès lors, deux manipulations peuvent se partager les préférences.

SÉRIE DE TUBES A HÉMOLYSE (PYREX) LONGS ET ÉTROITS							
Bouillon T . .	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	1 cm ³
Pénicilline . .	50	5	1	0,5	0,05	0,005	0,0005
Souche	I	I	I	I	I	I	I

Séjour à l'étuve six heures.

Les tubes sont mis à l'étuve *débouchés*, mais dans une boîte. Il nous est apparu que le bouchage apporte des perturbations d'un tube à l'autre : soit irrégularité de l'oxygénation, soit modification du pH par dissolution irrégulière des gaz ambiants (vérification facile à réali-

ser). Enfin, la pratique et l'expérimentation révèlent qu'en six heures des tubes témoins de bouillon ne se souillent pratiquement pas (1).

Dans chaque tube, nous ajoutons ensuite 1,5 cm³ d'eau distillée et nous introduisons une fine tige d'acier inoxydable de 12 mm de long, ce qui permettra une agitation très uniforme.

Puis répartition : 1 goutte par cellule (ou 1 goutte même ment diluée si les cultures sont trop riches) et aussitôt 1/2 cm³ de gélose ; on mélange en agitant la plaque.

(Il faut éviter de laisser séjourner la goutte sur le fond de la cellule pour éviter l'étalement des germes qui décantent et adhèrent, de laisser prendre la gélose avant ou pendant l'agitation de la plaque, et la plaque terminée, de la manipuler avant sa prise solide.)

Voici un exemple de résultats avec *Streptococcus hemolyticus*, dans l'ordre du schéma :

Nombre de colonies . . .	6	92	200	240	1 080	7 680	10 080	12 000
--------------------------	---	----	-----	-----	-------	-------	--------	--------

La souche contenait environ 500 germes par unité de lecture, révélée par culture témoin en l'une des cellules (voir ci-dessous).

Les tubes 1 et 2 apparaissent limpides. Nous voyons donc que l'antibiotique exerce son activité bien au delà de l'unité si nous nous référons au tube témoin.

On peut évidemment utiliser directement les cellules des plaques.

Par cellule : 1 goutte de chaque dilution d'antibiotique. 1 goutte de la souche (la suspension devra être ici sensiblement plus riche).

L'on n'omettra pas la cellule témoin où 1 goutte d'eau remplacera l'antibiotique.

Gélose, agitation, étuve.

Cette deuxième manipulation, nous l'utilisons surtout pour la recherche de la présence des antibiotiques dans les humeurs. Ainsi, l'apport de sérum ne peut perturber la bonne marche de la recherche, ce qui ne manquerait pas avec le premier procédé.

La lecture des plaques se fera en principe après vingt-quatre heures d'étuve (elle peut se faire sensiblement plus tôt).

Pour cette lecture, on se servira d'un cache perforé qui découpe 4 champs symétriques de la cellule (la somme de ces 4 champs, lus à l'objectif 2, est pour nous l'unité de lecture). On fera la lecture de préférence à l'objectif 2, parfois à l'objectif 3, accessoirement à la loupe.

Pour la concordance des résultats, il suffira évidemment d'établir une fois pour toutes le rapport des champs de vision.

Bien entendu, l'on fera usage d'un oculaire quadrillé qui permettra, dans le cas de trop riche culture, la lecture de segments de champ.

(Pour l'usage de l'objectif 3, il est à conseiller de faire dessécher partiellement les plaques à l'étuve pour projeter les colonies sur un même plan de vision.)

(1) Nous ne disons pas que nous sommes toujours à l'abri de toute souillure dans de telles conditions, mais cette méthode n'est proposée que comme un appareillage de mesure. Or nous ne voyons pas quelle perturbation apporte une colonie étrangère parmi des milliers d'autres, en somme marge d'erreur inhérente à tout appareil de mesure comparé à la mesure étalon.

NOTE IMPORTANTE. — Pour ce qui concerne les manipulations des micro-organismes, il est admis que le véhicule doit être le soluté physiologique. Or, le soluté physiologique est nocif pour des germes tel le *Staphylococcus aureus*, même pour un séjour peu prolongé. Quant au *Streptococcus hemolyticus*, il ne supporte même pas certaines eaux distillées, nocives en raison d'un pH variable. C'est là une observation de longue pratique. De plus, l'utilisation des plaques par numération des colonies de souches utilisées dans de telles conditions en confrontation avec les témoins en eau peptonée révèle le bien-fondé de cette notion.

C'est ainsi que, pour éviter cette source d'erreurs, nous n'utilisons jamais dans toutes ces manipulations que l'eau peptonée (pH 7).

En résumé, afin d'apporter plus de précision à la recherche de l'activité d'un antibiotique, nous proposons une méthode par numération de colonies obtenues sur boîtes de Petri miniatures, découpées dans une plaque de métal collée à la paraffine sur plaque de verre (12 boîtes par plaque 9 cm × 12 cm) et de manipulation commode sur la platine du microscope.

STREPTOMYCINO-RÉSISTANCE D'UNE SOUCHE DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLÉE D'UN LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN

par E. R. BRYGOO.

(Institut Pasteur de Saigon.)

L'acquisition par les germes pathogènes d'un pouvoir de résistance ou de tolérance aux antibiotiques au cours des traitements prolongés est un problème d'actualité. L'occasion nous a été donnée d'assister, dans des conditions particulièrement favorables, à un phénomène de cet ordre.

Huit jours après la confirmation bactériologique du diagnostic de méningite à pneumocoques chez un enfant (médecin traitant : Dr P. Brusq, Hôpital Grall), la culture du L. C. R. permet d'isoler une souche de *Ps. aeruginosa*.

Pendant quarante jours, il fut possible de retrouver régulièrement ce germe dans le L. C. R. (les huitième, treizième, dix-septième, vingtième, vingt-cinquième et quarantième jours). L'enfant mourut trois jours après le dernier examen.

Les germes étaient peu abondants dans les premiers prélèvements, 3 à 4 par millimètre cube. A partir du quinzième jour, le nombre s'éleva progressivement, l'examen direct ne fut cependant jamais positif.

Le L. C. R. resta opalescent ou louche, il ne devint purulent, jaune

verdâtre, qu'au moment de la crise terminale (1). La réaction cellulaire était de l'ordre de 800 éléments par millimètre cube, lymphocytes et polynucléaires altérés sensiblement en nombre égal, il est difficile de faire le partage de ce qui revient à l'action propre du germe et de ce qui résulte de l'action irritante du traitement par la streptomycine injectée par voie rachidienne.

Caractères de la souche. — Cette souche de *Pseudomonas aeruginosa* n'a que des caractères classiques. Elle se développe aussi bien à 37° qu'à 26°, aussi facilement en aérobiose qu'en anaérobiose, la gélose Veillon est régulièrement fragmentée par une explosion de bulles de gaz. Elle n'attaque aucun sucre, peptonise le lait en quarante-huit heures, liquéfie le sérum de bufflon en trois jours, ne produit pas d'hémolysine. Cette souche forme en grande abondance pyocyanine et fluorescine avec les caractères habituels à ces pigments.

Etude de la streptomycino-résistance. — La recherche de la sensibilité du germe à l'égard de la dihydrostreptomycine fut faite par ensemencement en bouillon ordinaire de quantités égales d'une suspension microbienne, les tubes de bouillon ayant reçu au préalable une quantité de streptomycine variant de 5 unités à 10 000 unités par millilitre. Etuve à 37°, lecture toutes les vingt-quatre heures.

La sensibilité à la streptomycine fut simultanément recherchée pour : Deux souches de pyocyanique de la collection de l'Institut Pasteur de Saigon, l'une isolée d'un liquide céphalo-rachidien en 1947, l'autre isolée en 1946 d'une urine (à titre de témoins).

Trois « clones » (2) de la souche étudiée : P1, P2, P3, isolés les deuxième, dixième, dix-septième jours.

1° Après vingt-quatre heures d'incubation, alors que la croissance était inhibée pour les souches témoins par 5 unités par millilitre, il fallait 1 000 unités par millilitre pour les clones P1, P2, P3, soit une quantité d'antibiotique deux cents fois plus élevée pour obtenir un effet bactériostatique. Les moyens dont nous disposions ne nous ont pas permis de mettre en évidence de différence de sensibilité entre ces 3 clones après vingt-quatre heures de culture.

2° Le septième jour d'incubation, aucun signe de croissance n'était visible avec 100 unités par millilitre pour les souches témoins, pour P1 avec 2 000 unités par millilitre, pour P2 avec 5 000 unités par millilitre. L'ensemencement ultérieur étant resté négatif, il est permis de parler d'effet bactéricide, la dose nécessaire étant vingt fois plus forte pour P1 et cinquante fois plus forte pour P2 que pour les témoins.

3° 10 000 unités par millilitre n'ont pu retarder la croissance de P3 que pendant quatre jours, cette dose étant la plus élevée utilisée pour cette expérience ; le taux bactéricide, s'il existait, n'a pu être déterminé.

(1) Cette modification brutale de l'aspect du L. C. R. fait penser à une reviviscence possible de l'affection pneumococcique initiale. La preuve bactériologique n'a pu dépendant en être faite, l'examen direct et la culture n'ayant pas montré de pneumocoques.

(2) Le clone a été défini par WEBER (1903) comme « l'ensemble de tous les individus descendus d'un individu unique par divisions directes ou asexuées ». Cf. A.-R. PRÉVOT, *Manuel de classification et détermination des anaérobies*. Masson 1948, p. 6.

On peut conclure de ces observations que la souche étudiée, déjà particulièrement résistante à la streptomycine dès le deuxième isolement, a acquis par la suite une résistance considérable, sinon totale, et du moins complètement en dehors des limites des doses thérapeutiques.

Etude du pouvoir pathogène. — Cette étude a été pratiquée sur un clone isolé le dix-septième jour.

L'inoculation intrapéritonéale de 1 cm³ d'une culture en bouillon de vingt-quatre heures (première subculture) ne provoque aucun symptôme chez le cobaye. Le même produit inoculé par voie sous-cutanée ne provoque qu'une petite escarre locale de 5 mm guérissant en quelques jours.

L'inoculation intracérébrale de 2/10 de centimètre cube d'une suspension en eau physiologique d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose tue le cobaye en vingt-quatre heures (2 animaux sur 2), mais les signes sont ceux d'une intoxication et si la reprise du germe est possible localement, la culture du sang du cœur est négative.

Conclusions. — La présence de *Pseudomonas aeruginosa* a pu être constatée pendant plus de quarante jours dans un liquide céphalo-rachidien.

Malgré son entretien chez un être vivant, cette souche n'a pas acquis de virulence particulière pour l'animal.

Il a été possible d'objectiver l'acquisition progressive par cette souche d'un haut pouvoir de streptomycino-résistance.

PRÉSENCE DANS LES EXTRAITS DE CULTURE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* D'UN FACTEUR FAVORISANT LA CROISSANCE DES CHAMPIGNONS LEVURIFORMES DU GENRE *CANDIDA*

par E. R. BRYGOO et R. SEYS.

(Institut Pasteur de Saïgon.)

La présence fréquente de champignons levuriformes du genre *Candida* dans l'expectoration des tuberculeux pulmonaires a été signalée par de nombreux auteurs. Il était intéressant de rechercher quelles pouvaient être les interactions des *Candida* et de *Mycobacterium tuberculosis*.

Ayant ensemencé sur milieu de Sauton des levures du genre *Candida*, nous avons constaté que ce milieu est très peu favorable à leur croissance. Mais, si au lieu d'utiliser du Sauton neuf, on emploie le Sauton modifié par une culture préalable de BCG, ou par addition d'un extrait de cette culture, on constate que la croissance des

Candida est très active, aussi active que sur le milieu de Langeron, milieu de choix pour ces espèces. L'action favorisante est proportionnelle à l'âge de la culture de BCG sur le milieu de Sauton utilisé (entre 6 et 21 jours). Cette action est indépendante de l'alcalinisation du milieu.

Ainsi, pour les *Candida*, la croissance du BCG n'a pas appauvri ce milieu synthétique : elle lui a, au contraire, apporté des facteurs indispensables à la croissance de la levure.

L'action favorisante s'est montrée constante pour les différentes espèces étudiées : *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, ainsi que pour une *Candida* azymatique, L6, en cours de détermination. Mais, pour chaque espèce, l'action varie selon son mode de croissance habituel en milieu liquide. C'est ainsi que pour *C. albicans*, il n'y a qu'une augmentation du trouble et du dépôt, tandis que pour les trois autres espèces, formant habituellement un voile et un anneau, ceux-ci se développent avec une précocité et une intensité particulières.

Cette augmentation importante de la vitesse de croissance sur milieu de Sauton modifié ne s'accompagne d'aucune modification morphologique appréciable. Il ne s'agit d'ailleurs pas d'une augmentation de la vitesse absolue de croissance, mais seulement de la normalisation d'un phénomène très amoindri par la carence du milieu.



Pour comparer l'action de différents extraits, nous les avons préparés de la façon suivante : après incubation jusqu'à croissance maxima, le ballon de culture est porté pendant une heure à 100° C. Après refroidissement, on filtre sur bougie L3, et on réduit au 1/10 du volume par ébullition sous pression réduite.

Les extraits ainsi obtenus sont dilués dans de l'eau distillée de 10⁻¹ à 10⁻⁶. De chacune de ces dilutions, on met 11 gouttes dans 10 ml de Sauton réparti en tubes de 22 x 220 mm (la dilution finale est ainsi cent fois plus élevée).

L'ensemencement est fait avec 1 goutte d'une suspension de la levure étudiée : une anse d'une culture de quarante-huit heures sur gélose Langeron dans 5 ml d'eau physiologique. Il est important de mettre dans les différents tubes des quantités égales de la suspension de levure, puis d'agiter les tubes afin d'homogénéiser leur contenu pour éviter les dépôts en surface qui fausseraient les lectures.

Les résultats se lisent après quarante-huit heures d'incubation à 25-30°. Une seconde lecture, pratiquée le quatrième jour, ne fait, en général, que confirmer la première.

Ensemencés avec une *Candida* poussant en voile, le bouillon ordinaire et le bouillon Langeron donnent en vingt-quatre à quarante-huit heures un voile complet couvrant toute la surface du tube et un anneau remontant sur les bords sur une hauteur de 4 à 8 mm. Ensemencé avec la même levure, le milieu de Sauton ne montre, même après huit jours d'incubation, que quelques îlots de culture au centre de la surface du liquide. L'addition d'extrait de Sauton neuf ne favorise pas la croissance.

On ne compte comme positifs (croissance favorisée) que les tubes

dans lesquels en quarante-huit heures est apparu un anneau de 4 mm au moins.

Les premières expériences ayant démontré la présence dans le milieu où avait été cultivé le BCG d'un ou plusieurs facteurs favorisant la croissance des *Candida*, nous avons cherché, dans la limite de nos moyens, à préciser quels étaient les éléments actifs. Nous poursuivons ces recherches, mais il nous a paru intéressant de présenter dès maintenant nos premiers résultats :

1° L'addition, au milieu de Sauton neuf, d'une suspension de bacilles BCG en eau physiologique, a montré une action favorisante jusqu'à la dilution de 10^{-3} , que les germes aient été utilisés vivants ou tués par chauffage pendant trente minutes à 60°.

2° Le facteur favorisant se retrouve dans la tuberculine brute : une action très nette de celle-ci se manifeste au taux de 10^{-5} . Une tuberculine, fraîchement préparée, suivant la technique ci-dessus, à partir de notre souche de BCG, s'est montrée encore plus active : action jusqu'à 10^{-6} . Le chauffage à 100° pendant une heure n'a donc pas détruit le facteur favorisant.

Ce phénomène peut ainsi servir de base à une méthode simple et rapide de titrage de la tuberculine *in vitro*.

3° L'antigène méthylrique s'est montré absolument sans action.

4° Divers extraits microbiens, préparés suivant la même technique, ont donné des résultats du même ordre : c'est ainsi que l'extrait de *Escherichia coli* agit à la dilution de 10^{-1} (1 ml d'extrait de culture pour 9 ml de milieu de Sauton) ; ceux d'*Alcaligenes fecalis* et de *Malleomyces pseudomallei* à la dilution de 10^{-3} . Mais, différence essentielle, les *Candida* poussent très bien sur bouillon ordinaire, milieu de culture utilisé pour les germes ci-dessus, et l'extrait de bouillon neuf ajouté au milieu de Sauton suffit pour activer la croissance dans des conditions comparables : 10^{-3} .

Conclusions. — Il existe dans les produits du métabolisme ou de la lyse du *Mycobacterium tuberculosis* et du BCG un facteur qui favorise la croissance des champignons levuriformes du genre *Candida*.

Ce facteur se trouve dans les extraits du type de la tuberculine. Il est actif à la dilution de 10^{-5} .

DIAGNOSTIC D'UN CAS DE FIÈVRE Q PAR L'EXAMEN CYTOLOGIQUE DES EXPECTORATIONS

par J. STEINMANN.

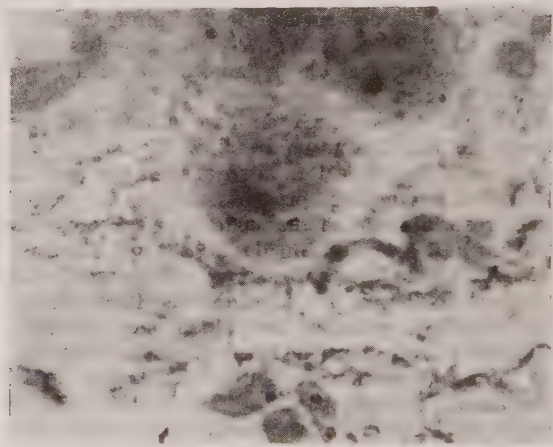
(Genève)

Il est d'un grand intérêt pratique, en présence d'un malade atteint d'un syndrome pneumologique du groupe des pneumonies atypiques, éveillant l'idée d'une fièvre Q, de faire un diagnostic précoce de l'infection en cause. En effet, l'agglutination par le sérum du malade

de *Rickettsia burneti*, qui permet le diagnostic étiologique, se manifeste assez tard (le vingt-neuvième jour seulement dans une observation de Gsell [4]), et son résultat vient trop tard pour orienter le diagnostic et la thérapeutique.

Or il semble évident que le virus est présent dans les crachats (Campanopetros [2]) et que la contamination par l'expectoration représente un des modes de transmission interhumaine de la maladie. D'autre part, Hengel, Kausche et Sheris [3] ont pu mettre en évidence, au cours des infections expérimentales de l'animal, des *Rickettsies* typiques dans les sécrétions et les produits pathologiques.

Il n'est donc pas vain de penser que l'on puisse, chez un malade atteint de pneumonie atypique, faire un diagnostic par l'examen cyto-



logique de l'expectoration. C'est ce que nous avons eu l'occasion de réaliser dans un cas où l'examen microscopique des crachats nous a permis de poser le diagnostic de la fièvre Q dix jours avant le résultat des agglutinations.

Un homme de 57 ans fait un frisson brutal le 24 janvier 1950. A la Clinique médicale de Genève (professeur Roch), la constatation radiologique de deux plages d'opacification pulmonaire diffuse le classe dans le groupe des pneumonies atypiques. L'auréomycine amène une défervescence rapide. Le 3 février 1950 et le 7 février 1950, nous examinons les expectorations du malade. Elles se présentent sous l'aspect de crachats muco-purulents, à flore modérément abondante, banale, riche en polynucléaires et en macrophages.

Parmi ces derniers, un certain nombre, généralement disposés en colonies, montrent dans leur protoplasma des granulations irrégulières quoique de taille sensiblement égale, polyédriques ou en courts filaments, colorées en rouge violet (May-Grünwald-Giemsa). Parfois le noyau est respecté, mais en général toute la cellule en est bourrée, sans qu'il soit possible de dire si ces granulations se trouvent à l'inté-

rieur du noyau ou s'il s'agit d'éléments accolés à sa surface. La plupart sont intimement liées au protoplasma, quelques-unes seulement sont logées dans de petites vacuoles. Contrairement à ce qu'ont décrit Ströder, Wiegerth et Simrock [4] dans une observation semblable, les grosses vacuoles en sont dépourvues et semblent au contraire les refouler à leur périphérie. A côté des macrophages infectés, d'autres macrophages et les polynucléaires tranchent par leur protoplasma clair, finement granuleux.

La figure 1 montre assez bien les formations observées dont la morphologie est un symptôme typique qui permet d'orienter le diagnostic vers une thérapeutique précoce et efficace.

BIBLIOGRAPHIE

- [4] O. GSELL. *Helv. med. Acta*, 1950, **17**, 279.
- [2] CAMINOPETROS. *Ces Annales*, 1949, **77**, 750.
- [3] HENGEL, KAUSCHE, SHERIS. *Deutsch. med. Wschr.*, 1950, **75**, 1505.
- [4] STRODER, WIEGERTH et SIMROCK. *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.*, 1949, 644.

ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE DE DEUX PROTÉASES GASTRIQUES CRISTALLISÉES

par G. MILHAUD.

(Institut Pasteur. Service des Fermentations.)

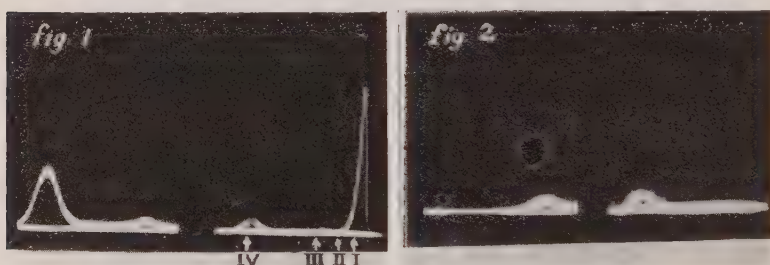
Le travail de Ågren et Hammarsten [1] a montré que la pepsine migre vers l'anode et que l'on obtient une augmentation de l'activité au cours de ce processus, les impuretés se déplaçant vers la cathode (tampon acide chlorhydrique-citrate, pH 3,34).

Un peu plus tard Tiselius et ses collaborateurs [2] ont trouvé que de nombreuses préparations de pepsine cristallisée contenaient à côté d'une composante principale quelques impuretés. Ils purent purifier à l'aide de l'électrophorèse ces préparations et augmentèrent leur activité de 31 à 69 p. 100. La pepsine purifiée se comporte comme un acide et conserve sa charge négative pour tous les pH compris entre 1 et 4,5. Ils émirent l'opinion que ce comportement tenait à une affinité exceptionnelle pour un anion. Enfin Northrop [3] a essayé avec Herriot et Desreux de purifier électrophorétiquement des échantillons de pepsine contenant plusieurs constituants mis en évidence par la courbe de solubilité. Au pH 4,4, ils ne purent réaliser aucune séparation et l'activité demeura constante. Des mélanges de préparations possédant une forte et une faible activité migrèrent à la même vitesse et l'activité demeura inchangée. En outre le point iso-électrique de la pepsine dissoute doit être inférieur au pH 1,5. Comme la pepsine contient au moins deux groupes —NH_2 , il est probable qu'elle renferme une fonction fortement acide, l'acide phosphorique par exemple, qui maintient la charge négative de la particule, même au pH de 1,5.

Récemment, Hoch [4] a analysé à l'aide de l'électrophorèse de la pepsine de porc et a observé que 96 p. 100 de sa préparation migrerait de façon homogène aux pH 3,9-5,9 et 8. Mais en prolongeant la durée de l'électrophorèse, la pepsine se révélait hétérogène, particulièrement au pH 5,9, et 4 fractions purent être distinguées.

Nous avons soumis à l'électrophorèse de la pepsine recristallisée quatre fois [5] et dosé les deux activités protéolytiques que ce ferment manifeste. En effet, le suc gastrique humain et la pepsine cristallisée possèdent, en quantités sensiblement égales, deux activités protéolytiques distinctes, dont les pH optima sont 2,2 pour la pepsine I (pepsine de Schwan) et 3,3 pour la pepsine II (cathepsine de Freudenberg [6] et Buchs [7]) en utilisant de l'édestine comme substrat. Nous nous sommes demandé si la séparation électrophorétique accumulerait dans une fraction l'une ou l'autre activité protéolytique.

Partie expérimentale. — On dissout 250 mg de pepsine de porc cris-



tallisée quatre fois et dialysée dans 11 cm³ de tampon acétate-acide acétique de pH 4,77 et de $\mu = 0,1$ et on dilue de 10 p. 100 d'eau. L'analyse électrophorétique (1) permet de distinguer, dans la pepsine cristallisée, les trois constituants suivants (fig. 1) :

	POURCENTAGE	MOBILITÉ
Constituant. 1	75,6	$8,8.10^{-5}$ cm ² /volt/sec.
Constituant II	7,3	8,1
Constituant III	2,8	5,4
Constituant IV	14,3	0,5

L'activité protéolytique a été dosée en utilisant de l'édestine cristallisée comme substrat selon la technique précédemment décrite [7 et 8].

	PEPSINE I Pourcentage de digestion	PEPSINE II Pourcentage de digestion
Activité globale	88	88
Activité du grand gradient	79	76
Activité du petit gradient (fig. 2)	74	71

(1) Nous tenons à remercier M. E. Fischer, chef de travaux au Laboratoire de Chimie Organique de l'Université de Genève et M^{lle} O. Dupont, pour l'exécution des électrophorèses.

Le rapport des activités au taux d'azote de chaque fraction était sensiblement constant.

On voit que les variations des deux activités fermentaires sont comprises dans les limites d'erreur du dosage et que l'on ne peut séparer par électrophorèse la pepsine I de la pepsine II, ce qui semble confirmer que la pepsine cristallisée est un ferment unique possédant une double action protéasique [8].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. AGREN et E. HAMMARSTEN. *Enzymologia*, 1937, 4, 49.
- [2] A. TISELIUS, G. E. HENSCHEN et SVENSON. *Biochem. J.* 1938, 32, 1814.
- [3] J. H. NORTHROP. *Crystalline Enzymes*, New-York, 1939.
- [4] H. HOCH. *Nature*, 1950, 165, 278.
- [5] J. H. NORTHROP. *Erg. Enzymforsch.*, 1932, 1, 302.
- [6] E. FREUDENBERG. *Enzymologia*, 1940, 8, 452.
- [7] S. BUCHS. *Die Biologie des Magenkathepsins*, S. Karger. Bâle, New-York, 1947.
- [8] G. MILHAUD et P. LÉPINE. *Ces Annales*, 1949, 77, 335.

**UNE FORME ATYPIQUE
DE *BACILLUS MEGATHERIUM* DE BARY : *B. MEGATHERIUM*
var. *CAPILLATUM* nov. var.**

par BERTHE DELAPORTE, HENRI GIRARD, GISELE JACOBELLI
et MAURICE LEMOIGNE.

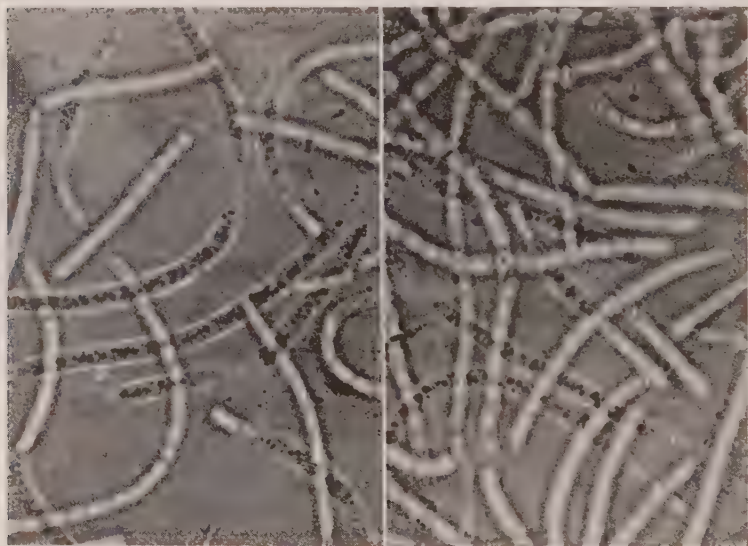
(Institut Pasteur.)

Au cours d'isolements de bactéries du sol nous avons constaté la présence d'un type de microbe remarquable par l'aspect filamenteux des chaînes de cellules [1]. Etant donné sa fréquence dans certaines terres et ses caractères très particuliers, il nous semble constituer un type facile à distinguer des autres. Nous le décrivons ici avec quelques détails.

Cette bactérie a été trouvée dans plusieurs échantillons de terre prélevés dans des pays à climat chaud : région méditerranéenne, aux environs d'Antibes (France) et du Caire (Egypte) ; Rio de Janeiro (Brésil). Elle a été isolée sur plaques de silicogel, imprégnées de 100 mg de nitrate de potassium et 300 mg de saccharose dans 2 cm³ de milieu minéral de Winogradsky et 1 cm³ de tampon pH 7,0. Elle donne sur ces plaques, par la méthode des grains de terre, des colonies rondes, bombées, crémeuses, brillantes, opaques, ressemblant à celles de *Bacillus megatherium*. Ces colonies peuvent être repiquées sur gélose et s'y développent bien. Mais ni sur gel de silice, ni, au début, sur gélose au bouillon de haricot peptoné et saccharosé, il n'y a de spores, même au bout de plusieurs mois, alors que presque toutes les

espèces de *Bacillus* sporulent rapidement sur ce dernier milieu. Par contre, sur gélose à l'extrait de viande-peptone, la plupart de ces souches forment de très nombreuses spores en vingt-quatre à quarante-huit heures. On observe aussi des spores sur milieu au haricot sucré lorsqu'on repique une culture poussée auparavant sur lait.

Les cultures de vingt-quatre heures ou davantage sont constituées presque exclusivement de chaînes extrêmement longues, pouvant dépasser 350 μ , dont les articles composants sont souvent difficiles à distinguer, les membranes transversales étant pour la plupart très peu visibles parce que l'intérieur des cellules est totalement rempli



Cultures de vingt heures à 30° C sur gélose extrait de viande-peptone.

de nombreux et gros globules réfringents serrés les uns contre les autres ; cela donne l'aspect de longs tubes. Mais en réalité ces pseudotubes sont segmentés par des cloisons transversales, surtout bien visibles au moment de la sporulation. Quelques rares cellules sont isolées ou en courtes chaînes. Les cellules des cultures de vingt-quatre heures sont très grosses ; elles ont, sur gélose ordinaire, de 1,7 à 2,7 μ de largeur sur 4,3 à 7,0 ou 10,0 μ de longueur et davantage ; sur gélose au bouillon de haricot saccharosé, elles sont un peu plus étroites, elles mesurent de 1,5 à 2,0 μ sur 3,4 à 8,0 ou parfois 13,0 μ . Les sporanges sont pour la plupart en très longues chaînes, sur gélose ordinaire ils mesurent 2,4 à 2,7 μ sur 2,6 à 5,2 μ , et ne diffèrent donc des dimensions des cellules normales que par leur longueur ; sur gélose au haricot saccharosé ils ont de 1,6 à 1,8 \times 3,0 à 4,7 μ . Les spores, ovoïdes, sont situées approximativement au centre de la cellule. Sur milieu ordinaire

elles mesurent 0,8 à 1,1 μ sur 1,7 à 2,6 μ ; sur milieu au haricot saccharosé elles sont un peu plus petites : 0,7 — 0,9 \times 1,3 — 1,7 μ .

Les cellules isolées ont des extrémités arrondies ou légèrement atténuées. Elles ne sont pas mobiles ; elles gardent le Gram.

Les cellules renferment de très nombreux et gros globules lipidiques qui sont bien visibles sous forme de grains réfringents dans les cellules vivantes non colorées. Ces globules se colorent électivement par les colorants spécifiques des lipides. Ce lipide est, comme celui des autres *Bacillus*, un produit de polymérisation de l'acide β -hydroxybutyrique [2]. La coloration par l'iode ne permet pas de constater la présence de glycogène. Les colorations spéciales montrent l'existence de capsules.

Sur gélose ordinaire (extrait de viande-peptone) mise à 30° C, les cultures de vingt-quatre heures sont épaisses, crémeuses, lisses, assez brillantes, opaques, d'un blanc grisâtre ; elles ont le bord net. Sur gélose haricot-peptone-saccharose elles sont plus abondantes, très épaisses, crémeuses, lisses, brillantes, opaques, blanches.

Les colonies de vingt-quatre heures à 30° C sur gélose au haricot sucré sont grandes, rondes, épaisses, bombées, lisses, très brillantes, opaques ; observées à la loupe (grossissement \times 10), le centre est assez opaque, granuleux, mais le bord montre des moirures. Observé avec un grossissement de \times 80, le bord des colonies se montre constitué par de très longs filaments bactériens raides, courbés, par mèches de quelques-uns situés parallèlement côte à côte. Parfois quelques filaments plus ou moins courbés envahissent la gélose environnante. Certains filaments ayant cru en boucle sont tordus sur eux-mêmes en torsade à deux brins. Ces aspects diffèrent nettement de ceux des colonies de *B. megatherium* et de *B. cereus* dans les mêmes conditions.

Les colonies de vingt-quatre heures à 30° sur gélose ordinaire sont assez grandes, arrondies, peu épaisses, à bord plus mince, crémeuses, lisses, brillantes, opaques. Observées à un grossissement de \times 10 elles montrent des bords moirés et à \times 80 de grosses bactéries.

Lorsqu'on fait des isolements par la méthode des dilutions successives en gélose coulée en boîte de Petri, les colonies situées à l'intérieur de la gélose sont en forme de lentilles. A un grossissement de \times 80 on voit souvent une expansion de quelques filaments bactériens raides, courts, faisant saillie en un point de la lentille. Cette forme lenticulaire des colonies rapproche ces souches de l'espèce *B. megatherium*.

Ces bactéries sont aérobies strictes.

L'optimum de température pour la croissance est situé entre 37° C et 41° C ; les cultures se développent peu à 24° et 45°, et ne poussent pas en trois jours en-dessous de 18° ni au-dessus de 45°.

Sur milieux spéciaux les aspects des cultures sont les suivants :

En bouillon de viande à la peptone Martin : le bouillon reste clair, le dépôt est léger, ou bien floconneux et assez abondant.

En gélatine ensemencée en piqûre : pas de culture.

En strie sur plaque de gélatine gélosée : pas de culture.

En lait : en tubes, ne pousse généralement pas — ou ne change rien, culture non discernable macroscopiquement — cependant une souche a peptonisé le lait, sans le coaguler, en trente-six jours, en l'alcalinisant,

une autre a produit une peptonisation partielle au bout de quatre mois. Sur lait gélifié, en boîte de Petri, la culture est abondante, mais la caséine n'est pas attaquée.

Sur pomme de terre, la culture est faible ou absente.

Sur sérum coagulé, la culture est très faible, le sérum non liquéfié.

Cette bactérie fait fermenter divers glucides, en acidifiant le milieu : arabinose, xylose, glucose, maltose, saccharose, mais non le lactose. Elle se comporte donc comme le *B. megatherium*, mais cependant ne fait pas fermenter le mannitol.

Elle pousse sur milieu nitraté, glucosé ou saccharosé (liquide agité ou gélose), par contre elle réduit les nitrates en nitrites et se comporte en ce dernier point non pas comme *B. megatherium* mais comme *B. cereus*.

Elle ne forme pas d'acétylméthylcarbinol décelable par la méthode de Voges-Proskauer avec addition de créatine.

L'ensemble de ces caractères rapproche beaucoup cette bactérie de *B. megatherium* ; cependant elle s'en distingue par des caractères assez importants : les formes filamenteuses constituées d'articles semblant extrêmement longs, en réalité plus courts mais quand même anormalement longs, la faiblesse des activités protéolytiques qui se manifeste par l'absence d'hydrolyse de la gélatine, de la caséine et du sérum, la réduction des nitrates en nitrites. Il semble que l'importance de ces différences — observées sur de nombreuses souches dès l'isolement — justifie la création d'un groupe spécial à l'intérieur de l'espèce *B. megatherium* ; nous proposons de nommer cette variété *capillatum*, voulant rappeler par ce mot l'aspect filamenteux des chaînes de cellules (1).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. LEMOIGNE, H. GIRARD et G. JACOBELLI. *C. R. Acad. Sci.*, 1950, **230**, 774 et *Ann. agronom.*, 1951, **2**, 89-101.
- [2] M. LEMOIGNE, B. DELAPORTE et M. CROSON. *Ces Annales*, 1944, **70**, 224-233.
- [3] E. N. MISHUSTIN et E. Z. TEPPER. *Microbiology*, 1948, **47**, 413-414.

(1) MISHUSTIN et TEPPER [3] ont récemment décrit une nouvelle espèce qu'ils n'ont pas rapprochée de *B. megatherium* : *Bacillus longissimus*, qui rappelle un peu l'aspect du bacille que nous décrivons ici, mais s'en distingue par l'absence de lipides, les filaments en zig-zag et non raides, le peu d'abondance et les conditions de culture, etc.

Comme ces auteurs n'ont pas utilisé les milieux habituels des bactériologistes, n'ont donné que trop peu de détails et que nous n'avons pu nous procurer la souche qu'ils ont décrite, il nous est impossible de pousser davantage la comparaison de ces souches récemment trouvées.

MISE EN EVIDENCE DES COLLAGÉNASES MICROBIENNES

par J. BRISOU.

(Laboratoire de l'Ecole de Santé Navale et Coloniale, Bordeaux.)

Nous avons insisté dans un précédent mémoire [1] sur le choix du réactif à mettre en œuvre pour la détection des collagénases microbiennes. La définition d'un enzyme est expressément gouvernée par son comportement vis-à-vis d'un substrat donné. Les collagénases ne peuvent échapper à cette loi ; elles sont donc les ferments capables d'attaquer le collagène à l'exclusion de toute autre substance. Or, le collagène « A » de Nageotte et M^{lle} Guyon ne répond pas aux caractéristiques du collagène : défini comme étant un haut polymère rigoureusement insoluble dans l'eau, les acides et les alcalis dilués, titrant de 78 à 90 p. 100 d'azote (1).

Le réactif que nous avons utilisé jusqu'ici était préparé à partir de tendons de veau ou de peau de jeune bœuf. Il faut souligner que le collagène est ce qu'il reste de cette matière première traitée successivement par des lavages répétés à l'eau salée, un séjour dans une solution active de trypsine ou de pepsine, une déshydratation par l'alcool, l'alcool-acétone et l'éther. Nous sommes donc loin du précipité salin d'un produit acido-soluble résultant de la macération des tendons dans une eau faiblement acétifiée. L'analyse chimique montre du reste que ce précipité ne contient que des traces d'azote.

Dans une nouvelle série d'expériences, la matière première choisie fut successivement : des tendons de queues de rats, des membranes fœtales et du cordon ombilical humains. Il est possible, en partant de ces organes, de préparer un collagène très purifié titrant 90 à 93 p. 100 d'azote (1). Les fragments de collagène ainsi préparés ont été soumis à l'action de cultures totales et de filtrats de culture des germes anaérobies suivants (2) :

<i>Welch. perfringens</i>	3 souches.
<i>Cl. histolyticum</i>	2 —
<i>Cl. sporogenes</i>	2 —
<i>Cl. œdematiens</i>	2 —
<i>Cl. bifermentans</i>	1 —
<i>Cl. aerofætidum</i>	1 —

Les bactéries étaient cultivées en milieu Vf papaïnique [2] qui, nous l'avons montré, respecte leur caractère pathogène. Dans ces conditions, seul *Cl. histolyticum* montre une activité collagénolytique indiscutable.

(1) Taux établis en multipliant par le coefficient moyen d'azote total des acides aminés (6,3), le chiffre d'azote total trouvé à l'analyse.

(2) Souches provenant des collections de l'Institut Pasteur de Paris.

Les fragments placés dans les cultures ou dans les filtrats de cultures de vingt-quatre heures sont rapidement dissociés et dissous.

Les filtrats conservés au frigidaire à $+ 4^{\circ}$ gardent leur pouvoir pendant environ huit jours. Au onzième jour ils sont sans action sur le réactif. Ce délai semble être la limite de stabilité des collagénases à $+ 4^{\circ}$.

Ces résultats confirment ceux que nous avons déjà publiés avec J. Milhade. Ils concordent avec ceux de N. W. Jenisson [3] qui utilise le tendon de veau comme réactif. Ils s'opposent par contre aux conclusions des auteurs qui préconisent la détection des enzymes par le collagène A [4]. Les divergences s'expliquent donc fort bien.

La collagénase de *Cl. histolyticum* offre des analogies avec la papaïne dont nous avons montré le pouvoir collagénolytique puissant [4].

Les autres souches anaérobies que nous avons soumises à l'expérimentation se sont constamment montrées inactives sur le collagène ; on ne peut donc les considérer comme productrices de collagénases au sens strict du mot.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BRISOU et J. MILHADE. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1951, **33**, 64.
- [2] J. BRISOU. *Ces Annales*, 1950, **79**, 331.
- [3] N. W. JENISSON. *J. Bact.*, 1945, **50**, 369.
- [4] M. DELAUNAY, M. GUILLAUMIE et A. DELAUNAY. *Ces Annales*, 1949, **76**, 16.

ÉTUDE DE L'ACTION D'UN ANTIHISTAMINIQUE DE SYNTHÈSE SUR LA TUBERCULOSE EXPÉRIMENTALE DU COBAYE

par F. TISON.

(Sanatorium de Praz-Coutant [Haute-Savoie].)

Carson, Layne et Campbell [1] ont montré l'effet inhibiteur des antihistaminiques *in vitro* sur les mycoses humaines. Courmont et Deriès [2] ont décelé à leur tour une action antibiotique sur le bacille de Koch *in vitro*.

Halpern et ses collaborateurs [3, 4] ont insisté au contraire sur l'action aggravante de ces corps sur l'infection banale et, au cours d'études très poussées, en ont montré le mécanisme. L'atténuation de la réaction inflammatoire locale par action sur la perméabilité capillaire autorise une diffusion plus rapide des germes injectés.

Or, nous avons montré [5] l'importance de la réaction locale qui, chez l'animal, pouvait retarder ou même empêcher la diffusion de la tuberculose expérimentale.

En tenant compte de ces constatations, nous avons voulu étudier si, au cours de la tuberculose expérimentale, le phénergan à haute dose ne pouvait accélérer la diffusion de la maladie, ce qui permettrait au point de vue pratique une réponse allergique plus rapide et une autopsie

plus précoce. Pour éviter un effet antibiotique possible nous avons injecté des doses fortes, mais seulement pendant les premiers jours de l'infection, au moment où une diffusion rapide serait intéressante.

Première expérience. — Deux groupes de cobayes de même poids ont été inoculés avec des produits négatifs aux examens optiques, et par conséquent, au plus, pauci-bacillaires.

52 groupes ont été inoculés, soit 104 cobayes.

Le groupe A servait de témoin.

Le groupe B était traité par 15 mg de phénergan sous-cutané par jour et par kilogramme d'animal (une injection toutes les douze heures). La dose est forte, car elle correspondrait pour un homme adulte à environ 1 g par jour.

Le traitement durait cinq jours après l'inoculation.

Nous avons alors suivi de très près :

L'apparition des ganglions ;

L'apparition de l'allergie (de dix jours en dix jours) ;

Les lésions à l'autopsie.

Nous n'avons constaté aucune différence dans un sens ni dans l'autre.

Nous avons alors voulu faire une expérience dans des conditions différentes :

Deuxième expérience. — Nous avons inoculé, cette fois, des doses importantes de bacilles à 8 groupes, soit 16 cobayes.

Le traitement par l'antihistaminique a duré dix jours.

L'autopsie a été plus ou moins précoce pour saisir les phases de la diffusion.

La réaction ganglionnaire, la période antéallergique, la répartition des lésions ont été les mêmes dans les deux groupes.

Conclusions. — Dans la tuberculose expérimentale du cobaye, l'antihistaminique étudié n'a pas d'influence sur la maladie. Ce médicament n'a pas de portée pratique pour accélérer les réponses du laboratoire.

Peut-être cette expérience limitée contribuera-t-elle à dissiper les appréhensions fréquentes consécutives à la prescription de ce médicament chez les tuberculeux.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CARSON, E. LAYNE et C. CAMPBELL. *Science*, 1950, **111**, 689.
- [2] COURMONT et DERIES. *C. R. Soc. Biol.*, 1951, **145**, 335.
- [3] HALPERN, BENACERRAF, PEAN et SALVA. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 667.
- [4] HALPERN, DUMAS, HEBER. *Sem. Hôp. Paris*, 1950, **38**, 1813.
- [5] F. TISON. *Ces Annales*, 1948, **74**, 512.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur*.

Traitement de la brucellose (*B. melitensis*) expérimentale du cobaye par le B. A. L. (2,3 dimercaptopropanol ou dithioglycérol) seul ou associé au chloramphénicol ou à l'auroémicine, par G. RENOUX.

Réaction allergique d'une variété de *Nicotiana tabacum* vis-à-vis de la mosaïque du tabac, par J. CUZIN, D. SCHWARTZ et C. BRETON.

Sur les modifications *in vivo* des caractères de quelques vibrions isolés des eaux en période d'épidémie de choléra, par J. GALLUT.

Effet du plasma prélevé chez les cobayes traités par la cortisone sur les cultures *in vitro* de fibroblastes et de macrophages, par M. BARBER et A. DELAUNAY.

Sur la présence simultanée de deux types bactériophagiques (D1 et D6) dans une culture de *Salmonella typhi*, par A. JUDE et P. DUCREST.

Recherches comparatives sur *Actinobacterium cellulitis* et *Actinobacterium baudeti*, par A. R. PRÉVOT, C. MAZUREK et P. TARDIEUX.

Test de séro-protection antityphoïdique sur l'embryon de poulet, par J. GRABAR et S. LE MINOR.

Le déterminisme de la sporulation des Bacillacées. I. Le rôle de l'aération chez deux variantes d'une souche de *Bacillus megatherium*, par N. GRELET.

Le Gérant : G. MASSON.